

Stefanie Marzian

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die molekulare Pharmakologie der Kv1-Ionenkanalfamilie –
Systematische Analyse und Charakterisierung der
Modulation durch Psora-4 und Arachidonsäure**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stefanie Marzian
geboren in Gelsenkirchen

Marburg, 2015

Stefanie Marzian

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
12.02.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Niels Decher

1. Korreferent: Prof. Dr. Carsten Culmsee

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary	2
1. Einleitung	3
1.1 Charakteristika und Funktionen von Ionenkanälen	3
1.1.1 Ionenkanäle.....	3
1.1.2 Die Konformationen spannungsgesteuerter Ionenkanäle.....	5
1.1.3 Die Kv-Kanäle	6
1.1.4 Die Funktion des Kv1.5-Ionenkanals	7
1.2 Die Struktur der Kv-Kanäle	8
1.2.1 Die Kristallstruktur der Kv-Kanäle	8
1.2.2 Die zentrale Pore der Kv-Kanäle	9
1.2.3 Der Spannungssensor der Kv-Kanäle.....	10
1.2.4 Die geschlossene Konformation der Kv-Kanäle	13
1.2.5 Die ILT-Mutante und das „internal cluster“	14
1.2.6 Laterale Öffnungen in der Kristallstruktur des NavAb-Ionenkanals	16
1.3 Die Modulation von Kv-Kanälen	17
1.3.1 Die Inhibition und Regulation von Kv-Kanälen	17
1.3.2 Die klassische Medikamenten-Bindungsstelle	19
1.3.3 Bupivacain.....	21
1.3.4 Psora-4.....	22
1.3.5 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren	23
1.4 Zielsetzung der Dissertation	26
2 Materialien/Methoden	28
2.1 Molekularbiologie	28
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten: Gelelektrophorese.....	28
2.1.3 Mutageneseprimer.....	28
2.1.4 Mutagenese.....	29
2.1.5 Bakterienstämme.....	29
2.1.6 Anzuchtverfahren und Medien der <i>Escherichia coli</i> Bakterien des Stammes DH5α	30
2.1.7 Aufbewahrung der Bakterien: Glycerolstocks	30

2.1.8	Transformation	30
2.1.9	Retransformation	31
2.1.10	Plasmidisolierung aus Bakterien: Minipräparation	31
2.1.11	Plasmidisolierung aus Bakterien: Midipräparation	31
2.1.12	Konzentrationsbestimmung	31
2.1.13	Sequenzierungsprimer	32
2.1.14	Sequenzierung von DNA	32
2.1.15	Restriktionsverdau mutierter DNA-Abschnitte	32
2.1.16	Gelextraktion von DNA Fragmenten	34
2.1.17	Ligation	34
2.1.18	Linearisierung von cDNA-Plasmiden	35
2.1.19	<i>In-vitro</i> Transkription	35
2.1.20	Aufreinigung der cRNA: Präzipitation	36
2.2	Elektrophysiologie	36
2.2.1	Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	36
2.2.2	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten	37
2.2.3	Messlösung für TEVC-Messungen mit <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	37
2.2.4	Lösung zur Aufbewahrung der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	37
2.2.5	Injektionspipetten für die cRNA-Injektion in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	38
2.2.6	cRNA-Injektion	38
2.2.7	TEVC-Spannungsprotokolle	38
2.2.8	Pharmaka	39
2.2.9	Messelektroden für die TEVC-Messungen	40
2.2.10	TEVC Messstände	40
2.2.11	Datenanalyse	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Ein Hinweis auf eine Bindungsstelle außerhalb der zentralen Ionenkanalpore 41	
3.1.1	Die Inhibition des Kv1.5-Ionenkanals durch Bupivacain	41
3.1.2	Kv β 1.3 und Bupivacain konkurrieren um eine gemeinsame Bindungsstelle im Kv1.5-Ionenkanal	42
3.1.3	Die Position der Aminosäure L510 gibt einen Hinweis auf eine weitere Bindungsstelle im Kv1.5-Ionenkanal	43
3.2	Die Bindungsstellen und der Inhibitionsmechanismus von Psora-4	43
3.2.1	Charakterisierung der Psora-4-Affinität und Kv1-Spezifität	43
3.2.2	Alanin-Scan der zentralen Ionenkanalpore	46
3.2.3	Alanin-Scan des S5-Segments	49

3.2.4	Alanin-Scan des S4-S5-Linkers und des S4-Segments	51
3.2.5	Kontrollmessungen.....	52
3.2.6	Docking von Psora-4 in ein Kv1.5-Homologie-Modell	55
3.2.7	Molekulardynamische Simulationen von Psora-4 in der zentralen Pore und den hydrophoben Seitentaschen	57
3.2.8	Die nicht konservierten Seitentaschen ermöglichen die Psora-4 Kv1-Spezifität	61
3.2.9	Laterale Fenster zwischen der zentralen Kavität und den hydrophoben Seitentaschen fungieren als „Durchgang“ für Psora-4-Moleküle	64
3.2.10	Psora-4 interagiert mit der Porenschleife	67
3.2.11	Die Inhibition durch Psora-4 verhindert nicht das „Gating“ des Ionenkanals, löst keine elektromechanische Entkopplung aus und ist nicht spannungsabhängig	70
3.2.12	Der Psora-4-Inhibitionsmechanismus	73
3.3	HUFAs blockieren offene Kv1.1-Ionenkanäle („open channel block“)	77
3.3.1	RNA-Editierung in der zentralen Pore des Kv1.1-Ionenkanals verhindert die Inhibition durch HUFAs	78
3.3.2	Docking von Anandamid in ein Kv1.5-Homologiemodell.....	79
3.4	Die Interaktion von Kv-Kanälen mit Arachidonsäure	80
3.4.1	Der experimentelle Ansatz: Ein systematischer Alanin-Scan	81
3.4.2	1. Parameter: Die Inhibition durch 20 µM Arachidonsäure	82
3.4.3	2. Parameter: Die Veränderung des Peakstroms durch 20 µM Aa	85
3.4.4	3. Parameter: Die Aa-induzierte Inaktivierung.....	88
3.4.5	Die Zusammenfassung der Ergebnisse des systematischen Alanin-Scans	91
3.4.6	Aa gleicht durch Mutation verschobene $V_{1/2}$ -Werte aus	97
4	Diskussion	100
4.1	Die Bindungsstelle und der Inhibitionsmechanismus von Psora-4	100
4.1.1	Psora-4 bindet in der zentralen Pore und in den hydrophoben Seitentaschen.....	100
4.1.2	Die Ergebnisse des computergestützten Liganden-Dockings und der MDss	101
4.1.3	Der Inhibitionsmechanismus.....	101
4.2	Die Interaktion von Kv-Kanälen mit Arachidonsäure	103
4.2.1	HUFAs binden in der zentralen Pore des offenen Ionenkanals	103
4.2.2	Die Interaktionen von Aa und den Ionenkanälen ist nicht auf die zentrale Pore beschränkt	103

4.2.3	Der Effekt von Aa auf die Ionenkanäle ist nicht auf die Interaktion mit wenigen Aminosäuren zurückzuführen	104
4.2.4	Lipide sind für die Funktion des spannungsgesteuerten Ionenkanals von entscheidender Bedeutung	104
4.2.5	Der Selektivitätsfilter ist für die Interaktion mit Aa von Bedeutung	106
4.3	Hydrophobe Seitentaschen als Medikamenten-Bindungsstellen.....	106
4.3.1	Der Kv1.3-Inhibitor PAP-1	107
4.3.2	Hydrophobe Seitentaschen in Natrium- und Kalzium-Kanälen.....	109
4.4	Ausblick.....	110
5	Literaturverzeichnis	112
6	Anhänge	123
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	123
6.2	Abbildungsverzeichnis	126
6.3	Eigene Publikationen.....	129
6.4	Liste der akademischen Lehrer	130
6.5	Danksagung	131

Zusammenfassung

Die klassische Medikamenten-Bindungsstelle für kleine, hydrophobe Inhibitoren in spannungsgesteuerten Ionenkanälen befindet sich in der hochkonservierten zentralen Kavität. Überraschenderweise unterscheidet der Inhibitor Psora-4 zwischen verschiedenen Subtypen der spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle (Kv-Kanäle) und blockiert selektiv Kv1-Ionenkanäle. In der hier vorliegenden Arbeit wurde mittels zielgerichteter Mutagenese, Alanin-Scans, Dockings, molekulardynamischen Simulationen sowie „inside-out macropatch“-Experimenten gezeigt, dass Psora-4 in der hochkonservierten Bindungsstelle in der zentralen Kavität bindet. Zusätzlich bindet Psora-4 in vier weniger konservierten hydrophoben Seitentaschen, die sich auf der „Rückseite“ der porenformenden S5- und S6-Segmente einer Untereinheit und dem Spannungssensor S4 und dem S4-S5-Linker der benachbarten Untereinheit befinden. Das gleichzeitige Binden an beiden Bindungsstellen führt zur Bildung eines stabilen, nicht-leitenden Inhibitor-Ionenkanal-Komplexes. Diese Studie zeigt einen neuen Blockmechanismus, der die hohe Affinität, die Kooperativität, das benötigte Öffnen und Schließen des Ionenkanals („use dependence“) und die Selektivität für Kv1-Ionenkanäle erklärt. Die neu identifizierte, weniger konservierte Bindungsstelle in den hydrophoben Seitentaschen stellt die molekulare Basis für die Entwicklung spezifischer Kv-Kanal-Blocker dar.

Die Inaktivierungsrate der Kv-Kanäle ist ein entscheidender Faktor zur Frequenzmodulation in Neuronen. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Polyunsaturated fatty acids: PUFAs) modulieren die Kinetik von Kv-Kanälen und beeinflussen so die neuronale und kardiale Erregungsweiterleitung. Diese Studie zeigt, dass PUFAs an der Bindungsstelle in der zentralen Kavität binden und so die Passage von Ionen verhindern. Außerdem ergibt ein systematischer Alanin-Scan, der 132 Aminosäuren im S3-S4-Linker, S4-Segment, S4-S5-Linker, S5-Segment, den Porenschleifen und dem S6-Segment umfasst, ein deutlich erweitertes Bild der Interaktion zwischen PUFAs und Kv-Kanälen. Diese Studie zeigt, dass zusätzlich zur Blockade der zentralen Pore auch die Porenschleifen, die hydrophoben Seitentaschen, die lateralen Fenster und der Spannungssensor an der Modulation der Kinetik der PUFA-Inhibition beteiligt sind.

Summary

The classical drug binding site for small molecule inhibitors of voltage-gated ion channels is located in the highly conserved central cavity. Surprisingly the inhibitor Psora-4 discriminates between different voltage-gated potassium channel (Kv channel) subtypes and selectively blocks Kv1 channels. Ala-scanning mutagenesis, molecular modeling and inside-out macropatch-experiments show that Psora-4 binds to the highly conserved drug binding site in the central cavity and additionally to four less conserved hydrophobic binding pockets located on the “backsides” of the pore forming S5 and S6 and the pore helix of one subunit and the voltage sensor S4 and the S4-S5 linker of the neighboring subunit. Simultaneous occupation of both binding sites results in a stable non-conducting drug-channel complex. Thus, this study reveals a novel blocking mechanism which confers high affinity, cooperativity, use-dependence and selectivity to Psora-4 inhibition of Kv1 channels. The newly identified, less conserved binding site in the hydrophobic side pockets provides a molecular basis to develop specific Kv channel blockers.

The rate of inactivation of Kv channels is a critical factor of the neuronal firing rate. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) modulate the kinetics of Kv channels and thus influence neuronal and cardiac signaling. This study reveals that PUFAs bind to the drug binding site in the central cavity and occlude the permeation pathway. Furthermore, systematic ala-scanning mutagenesis including 132 residues in S3-S4 linker, S4, S4-S5 linker, S5, pore loops and S6 provides an advanced view of the interaction between PUFAs and Kv channels. This study reports that in addition to the pore block the pore loops, the hydrophobic side pockets, lateral fenestrations and the voltage sensor contribute to the modulation of PUFA blocking kinetics.

1. Einleitung

1.1 Charakteristika und Funktionen von Ionenkanälen

1.1.1 Ionenkanäle

Die Übertragung elektrischer Signale von Zelle zu Zelle ermöglicht es dem Organismus Informationen schnell weiterzuleiten und zu verarbeiten. Eine wichtige Voraussetzung für diese elektrische Informationsübertragung ist eine schnelle und reversible Veränderung des Membranpotentials. Im Ruhezustand liegt eine Potentialdifferenz zwischen dem Extra- und dem Intrazellulärraum vor. Diese wird als Ruhemembranpotential bezeichnet und liegt, je nach Zelltyp, bei ca. -70 mV. Wird der Intrazellulärraum bezogen auf den Extrazellulärraum positiver, so wird diese Veränderung des Membranpotentials als Depolarisation bezeichnet, wird der Intrazellulärraum im Vergleich zum Extrazellulärraum negativer, so spricht man von Hyperpolarisation oder Repolarisation.

Das Aufrechterhalten und die Veränderung des Membranpotentials erfordern spezielle Proteine, die es Ionen ermöglichen über die Lipiddoppelschicht zu gelangen. Ionenkanäle sind in der Zellmembran lokalisiert und ermöglichen es, Ionen die Zellmembran entlang eines Konzentrationsgradienten schnell zu passieren. Durch einen einzigen Ionenkanal können bis zu 10^8 Ionen pro Sekunde fließen.

Ionenkanäle beinhalten mehrere Transmembrandomänen, die unterschiedliche Funktionen haben. Einige bilden eine zentrale, wassergefüllte Pore, durch die die Ionen hindurchtreten und somit die Zellmembran passieren können. Ionenkanäle können selektiv für bestimmte Ionen sein. Diese Selektivität basiert auf der Beschaffenheit des Selektivitätsfilters, der von den sogenannten Porenschleifen gebildet wird. Ionen liegen sowohl im Intra- als auch im Extrazellulärraum hydratisiert, das heißt von Wassermolekülen umgeben, vor. Um den Ionenkanal passieren zu können, muss diese Hydrathülle abgestreift werden. Dieser Vorgang wird als Desolvatisierung bezeichnet und erfordert Energie. Durch die Interaktion des Ions mit dem Selektivitätsfilter wird das Ion resolvatisiert, wodurch Energie frei wird. Der Selektivitätsfilter interagiert spezifisch nur mit Ionen, die eine bestimmte Ladung und einen bestimmten

Radius aufweisen. Nur im Falle dieser spezifischen Interaktion ist die Resolvatisierungsenergie größer als die Desolvatisierungsenergie, so dass das Ion den Selektivitätsfilter passieren kann.

Die elektrostatische Stabilisierung des Ions im Ionenkanal ist für die Permeation von entscheidender Bedeutung. Einzelne Ladungen bestimmter Aminosäuren, die der Pore zugewandt sind, sichern diese Stabilität und damit den Durchtritt des Ions durch den Ionenkanal.

Die Regulation der verschiedenen Ionenkanäle ist vielseitig. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle werden durch bestimmte Membranpotentiale aktiviert. HCN (hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated cation) -Kanäle aktivieren beispielsweise durch Hyperpolarisation (Ludwig et al, 1998), während andere spannungsgesteuerte Ionenkanäle bei Depolarisation öffnen. In der Gruppe der ionotropen Rezeptoren löst die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor die Aktivierung des Ionenkanals aus. Weiterhin können auch mechanische oder thermische Stimuli sowie die Konzentration bestimmter Ionen oder Botenstoffe Ionenkanäle regulieren und aktivieren.

Durch das Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle können Aktionspotentiale ausgelöst werden. Aktionspotentiale können sich entlang der Zellmembran ausbreiten und gewährleisten die Weiterleitung des elektrischen Signals. Eine ausreichende Aktivierung von Ionenkanälen führt zu einer überschwelligenden Veränderung des Membranpotentials, die wiederum spannungsgesteuerte Ionenkanäle aktiviert. Im Intrazellulärraum liegen Natrium-Ionen in deutlich niedrigerer Konzentration (ca. 5-15 mmol/L) und Kalium-Ionen in deutlich höherer Konzentration (ca. 120-150 mmol/L) vor, als im Extrazellulärraum (ca. 140-150 mmol/L Natrium-Ionen und ca. 4-5 mmol/L Kalium-Ionen). Die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen im Intra- und Extrazellulärraum sowie die Spannung über der Membran liegen der Triebkraft des Stroms zu Grunde, der in Form der Ionen durch die Ionenkanäle fließt. Die beteiligten Ionenkanäle und die Form des Aktionspotentials unterscheiden sich in verschiedenen Zelltypen.

Ionenkanäle bestehen häufig aus mehreren Untereinheiten. Sie liegen als Dimere (z.B. K_2P -Kanäle (Coetzee et al, 1999)), Tetramere (z.B.

spannungsgesteuerte Kalium-Kanäle (Kv-Kanäle) (Coetzee et al, 1999)), Pentamere (z.B. nicotinerge ACh-Rezeptoren (Popot & Changeux, 1984)) oder Hexamere (z.B. Connexone (Revel & Karnovsky, 1967; Robertson, 1963)) vor. Die Untereinheiten lagern sich jeweils so zusammen, dass eine zentrale Ionenkanalpore entsteht.

1.1.2 Die Konformationen spannungsgesteuerter Ionenkanäle

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle können in den Konformationen offen (aktiviert), geschlossen (deaktiviert) oder inaktiviert vorkommen. Der Übergang vom geschlossenen zum offenen Zustand wird als Aktivierung, der umgekehrte Vorgang als Deaktivierung bezeichnet. In der offenen Konformation können Ionen durch die zentrale Kanalpore gelangen, so dass Strom über die Zellmembran fließt. Der Ionenkanal kann auch vom offenen in einen inaktiven Zustand übergehen. Dieses wird als Inaktivierung bezeichnet. Der inaktivierte Ionenkanal kann nicht sofort in den aktiven leitenden Zustand übergehen und wird auch als refraktärer Kanal bezeichnet. Eine Weiterleitung des Aktionspotentials ist somit begrenzt. Das Aktionspotential kann auf Grund der Refraktärität der Ionenkanäle nur in eine Richtung weitergeleitet werden und wird sich nicht automatisch auch rückwärts ausbreiten. Außerdem ist die maximale Frequenz der Aktionspotentiale begrenzt, da die Weiterleitung eines weiteren Aktionspotentials nur möglich ist, wenn die Ionenkanäle nach der Repolarisation der Membran wieder in den leitenden Zustand übergehen können.

Die Konformationsänderung des Ionenkanals, die der Inaktivierung zu Grunde liegt, unterscheidet sich grundlegend von der Deaktivierung. Zum einen kann eine Veränderung des Selektivitätsfilters eine langsame, sogenannte C-Typ-Inaktivierung, hervorrufen (Liu et al, 1996; Yellen et al, 1994). Beispiele für Ionenkanäle, die eine C-Typ-Inaktivierung aufweisen sind der Kv1.3- (Cahalan et al, 1985; Marom et al, 1993) und der Kv1.5-Ionenkanal (Snyders et al, 1993). Auch Inaktivierungspartikel können mit der zentralen Ionenkanalpore interagieren und zu einer „Blockade“ des Ionenkanals führen. Im Falle der Kv-Kanäle sind dies beispielsweise die N-terminalen Abschnitte der Untereinheiten (Hoshi et al, 1990; Zagotta et al, 1990) oder akzessorische β -Untereinheiten

(Heinemann et al, 1996; Rettig et al, 1994). Diese Form der Inaktivierung wird als N-Typ-Inaktivierung bezeichnet. Ein weiteres Mitglied der Kv1-Familie, der Kv1.4-Ionenkanal, weist diese Form der Inaktivierung auf (Tseng-Crank et al, 1993).

1.1.3 Die Kv-Kanäle

Die Kv-Kanäle liegen während des Ruhemembranpotentials im geschlossenen Zustand vor und aktivieren bei Depolarisation der Zelle. Dadurch kommt es dann zu einem Kaliumefflux aus der Zelle, wodurch diese repolarisiert. Die Kv-Kanäle nehmen somit einen wichtigen Einfluss auf die Repolarisation der Zelle und damit auf die Dauer des Aktionspotentials.

1987 ist der *Shaker*-Ionenkanal, ein Kv-Kanal, aus *Drosophila* kloniert worden (Kamb et al, 1987). Es wurden anschließend weitere Gene gefunden, die für Proteine kodieren, die zu dem Shaker-Ionenkanal homolog sind. Diese Gene werden als *Shal*, *Shab* und *Shaw* bezeichnet, die den folgenden Genfamilien in Säugetieren entsprechen: Dem *Shaker*-Ionenkanal entspricht die Kv1-Familie, dem *Shab*-Ionenkanal die Kv2-Familie, dem *Shaw*-Ionenkanal die Kv3-Familie und dem *Shal*-Ionenkanal die Kv4-Familie. Jede dieser Kv-Familien beinhaltet mehrere Ionenkanäle (Butler et al, 1990; Wei et al, 1990).

Die Kv-Kanäle setzen sich aus vier $Kv\alpha$ -Untereinheiten zusammen (MacKinnon, 1991). Jede $Kv\alpha$ -Untereinheit beinhaltet sechs Transmembrandomänen, die in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran vorliegen (**Abb. 1.1.3-1**). Die Transmembrandomänen werden auch Segmente genannt und als S1-S6 bezeichnet. Das S1-Segment liegt dem N-Terminus am nächsten.

Die Diversität der Kv-Kanäle wird dadurch erhöht, dass sich die $Kv\alpha$ -Untereinheiten verschiedener Kv-Kanäle zu Heterotetrameren zusammenlagern können, deren elektrophysiologische und pharmakologische Charakteristika sich von denen der Homomere unterscheiden (Christie et al, 1990; Isacoff et al, 1990). Auch die Interaktion der Kv-Kanäle mit akzessorischen $Kv\beta$ -Untereinheiten ist von großer Bedeutung (Sewing et al, 1996; Yu et al, 1996). Das alternative Spleißen des *Kvβ1*-Gens führt zur Synthese der $Kv\beta 1.1$ -, $Kv\beta 1.2$ - und $Kv\beta 1.3$ -Proteine. Durch die Interaktion der $Kv\beta$ -Untereinheiten mit

den Kv α -Untereinheiten werden die Ionenkanäle moduliert, so dass sich die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften verändern (Decher et al, 2005; England et al, 1995; Gonzalez et al, 2002b; Rettig et al, 1994).

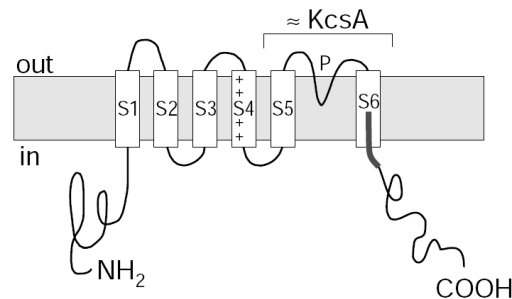


Abbildung 1.1.3-1: Die Struktur einer Kv α -Untereinheit der Kv-Kanäle

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung einer Kv α -Untereinheit eines Kv-Kanals. Das graue Rechteck stellt die Zellmembran dar, die weißen Rechtecke symbolisieren die Transmembrandomänen S1-S6. Die positiv geladenen Aminosäuren des S4-Segments sind als „+“-Zeichen markiert. Der Intrazellulärraum ist mit „in“ und der Extrazellulärraum mit „out“ beschriftet. Der Bereich der Porenschleife ist durch das „P“ hervorgehoben. Der C-Terminale Abschnitt, der mit „KcsA“ beschriftet ist, entspricht ungefähr dem homologen bakteriellen Kalium-Kanal KcsA (del Camino et al, 2000).

1.1.4 Die Funktion des Kv1.5-Ionenkanals

Der humane Kv1.5-Ionenkanal nimmt einen wichtigen Einfluss auf das kardiale Aktionspotential, da dieser Kanal in den atrialen Kardiomyozyten, nicht aber im Ventrikel exprimiert ist. Der Kv1.5-Ionenkanal liegt dem I_{kur} zu Grunde (Wang et al, 1993). Dieser weist eine schnelle Aktivierungskinetik auf und generiert bereits in der frühen Phase der Repolarisation einen sehr schnellen (englisch: „ultra rapide“) Kalium-Auswärtsstrom, der die Repolarisation der Kardiomyozyten und somit die Dauer der Aktionspotentiale beeinflusst (Snyders et al, 1993). Pharmaka, die den Kv1.5-Ionenkanal blockieren, regulieren somit die Dauer des Aktionspotentials im humanen Atrium.

1.2 Die Struktur der Kv-Kanäle

1.2.1 Die Kristallstruktur der Kv-Kanäle

Der bakterielle Kalium-Kanal KcsA aus dem Organismus *Streptomyces lividans* weist starke Homologien zu den Kv-Kanälen der Säuger auf. 1998 gelang es, den KcsA-Ionenkanal zu kristallisieren und mittels Röntgenstrukturanalyse ein genaues Modell der Pore der spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle zu entwickeln (Doyle et al, 1998).

Mit dem rKv1.2-Ionenkanal ist 2005 ein spannungsgesteuerter Kalium-Kanal eines Säugers kristallisiert worden (Long et al, 2005). Dieses Modell beinhaltet alle sechs Transmembrandomänen und beschreibt daher unter anderem die porenbildenden Segmente und die Struktur der Spannungssensoren mit großer Genauigkeit (**Abb. 1.2.1-1**).

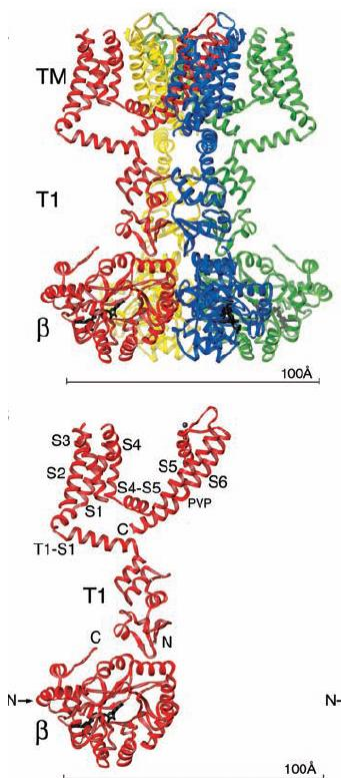


Abbildung 1.2.1-1: Die Kristallstruktur der rKv1.2-Ionenkanals

Die vier Untereinheiten des rKv1.2-Ionenkanals sind im oberen Teil der Abbildung in gelb, blau, grün und rot dargestellt. Der untere Abschnitt der Abbildung zeigt jeweils eine der vier Untereinheiten.

Die Transmembrandomänen sind nummeriert. Desweiteren ist der S4-S5-Linker mit „S4-S5“ beschriftet. Die Prolin-X-Prolin-Sequenz des S6-Segments ist mit „PVP“ gekennzeichnet. N- und C-Terminus sind entsprechend mit „N“ bzw. „C“ markiert. Im oberen und unteren Teil der Abbildung ist der Bereich, der in der Membran des Ionenkanals lokalisiert ist, mit „TM“ beschriftet. Außerdem sind die Kvβ-Untereinheiten mit „β“ markiert (Long et al, 2005).

1.2.2 Die zentrale Pore der Kv-Kanäle

Die S5- und S6-Segmente aller vier $Kv\alpha$ -Untereinheiten sind so zusammengelagert, dass sie die zentrale Ionenkanalpore bilden (Aiyar et al, 1994; Kirsch et al, 1993; Lopez et al, 1994).

Die S6-Segmente beinhalten eine Prolin-X-Prolin-Sequenz, welche zu einer Biegung der S6-Segmente und somit zu einer Begrenzung des Volumens der zentralen Kanalpore führt (**Abb. 1.2.2-1**). Dies ist charakteristisch für Kv-Kanäle (del Camino et al, 2000). Das typische Überkreuzen der S6-Segmente lässt die Struktur der Pore an ein umgedrehtes Indianerzelt erinnern. Sie wird als „inverted teepee“ bezeichnet (Doyle et al, 1998). Aktiviert der Ionenkanal, so knicken die unteren Abschnitte der S6-Segmente nach unten, öffnen so den Ionenkanal und ermöglichen die Passage von Ionen.

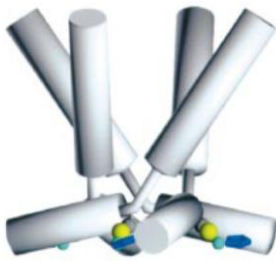


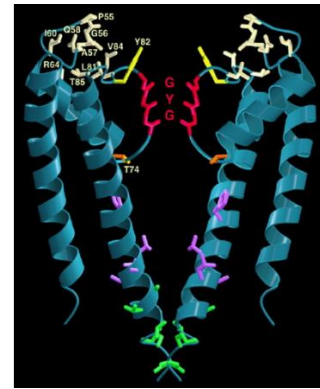
Abbildung 1.2.2-1: Die Struktur der zentralen Ionenkanalpore

Es sind die S6-Segmente der vier $Kv\alpha$ -Untereinheiten gezeigt. Die Prolin-X-Prolin-Sequenz führt zu dem charakteristischen Knick in den Segmenten und begrenzt die zentrale Ionenkanalpore (del Camino et al, 2000).

Die Verbindung zwischen den S5- und S6-Segmenten einer Untereinheit wird als Porenschleife bezeichnet. Die vier Porenschleifen des Tetramers beinhalten die sogenannte Signatursequenz der Kalium-Kanäle Glyzin-Tyrosin-Glyzin (GYG) (Doyle et al, 1998; Heginbotham et al, 1992). Diese fungieren als Selektivitätsfilter und bilden die obere Begrenzung der zentralen Ionenkanalpore (Hartmann et al, 1991; MacKinnon & Yellen, 1990; Yellen et al, 1991; Yool & Schwarz, 1991) (**Abb. 1.2.2-2**).

Abbildung 1.2.2-2: Der Selektivitätsfilter der Kv-Kanäle

Es sind in blau die porenbildenden Segmente zweier einander gegenüberliegenden Kv α -Untereinheiten eines spannungsgesteuerten Kalium-Kanals gezeigt. Hervorgehoben ist der Selektivitätsfilter, der durch die Porenschleifen gebildet wird und durch die charakteristische Sequenz Glyzin-Tyrosin-Glyzin (GYG) definiert ist (Doyle et al, 1998).



1.2.3 Der Spannungssensor der Kv-Kanäle

Die S1- bis S4-Segmente der Kv-Kanäle werden als „spannungswahrnehmende Segmente“ (voltage sensing domains, VSD) bezeichnet. Die S4-Segmente sind die Hauptspannungssensoren der Kv-Ionenkanäle (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Noda et al, 1984; Pathak et al, 2007). Sie beinhalten positiv geladene Aminosäuren in einer bestimmten Anordnung (Swartz, 2008): Jede dritte oder vierte Aminosäure ist Arginin oder Lysin. In der Zellmembran sind die VSDs um die porenbildenden Segmente herum angelagert (**Abb. 1.2.3-1**).

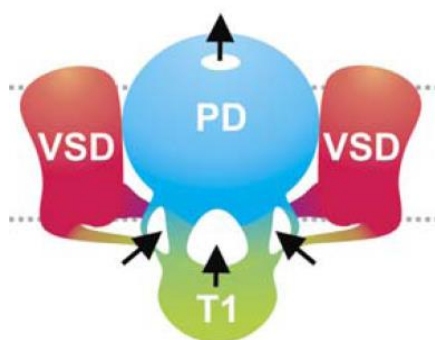


Abbildung 1.2.3-1: Die Anordnung der spannungswahrnehmenden Segmente im Ionenkanal

In rot sind die spannungswahrnehmenden Segmente dargestellt (VSD), in blau die porenbildenden Segmente (PD). Die Tetramerisierungsdomäne ist in grün gezeigt (T1). Die Lipiddoppelschicht ist mit den gepunkteten Linien angedeutet (Tombola et al, 2005).

Durch die Depolarisation bzw. die Repolarisation der Zellen werden diese positiv geladenen Aminosäuren bewegt, so dass sich die VSDs aller vier Untereinheiten verschieben. Diese Verschiebung der geladenen Aminosäuren

ist als Strom, als sogenannter „gating current“, messbar (Armstrong & Bezanilla, 1974; Bezanilla & Armstrong, 1974). Die Bewegung des S4-Segmentes trägt den Großteil zum „gating current“ bei, während die übrigen Segmente der VSDs nur einen minimalen Beitrag leisten (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Seoh et al, 1996). Als „gating charge“ wird die Ladung bezeichnet, die bei der Aktivierung oder Deaktivierung des Ionenkanals bewegt wird.

Bei Depolarisation sind zwei wichtige Bestandteile der Bewegung innerhalb des Ionenkanals zu unterscheiden. Zuerst bewegen sich lediglich die spannungswahrnehmenden Segmente und transportieren dabei den Großteil der „gating charge“. Der Ionenkanal befindet sich dann in einem aktivierten, aber dennoch nicht geöffneten Zustand, der als „activated-not-open state“ bezeichnet wird. Im Anschluss wird der restliche, kleinere Anteil der „gating charge“ transferiert, der zur Öffnung des Ionenkanals führt und die Passage der Ionen möglich macht (Fedida & Hesketh, 2001).

Die Kristallstruktur des KcsA-Ionenkanals beinhaltet nur die porenbildenden Segmente und die Kristallstruktur des rKv1.2-Ionenkanals zeigt den Kanal im offenen, aktivierten Zustand. Es existiert daher kein detailliertes Modell des geschlossenen Zustands und der genauen Bewegung der VSDs und des S4-S5-Linkers. In **Abb. 1.2.3-2** sind die zwei wichtigsten Modelle der Bewegung des Spannungssensors schematisch gezeigt. Zum einen erscheint es möglich, dass das S4-Segment eine recht große Bewegung durchführt und dabei durch die Lipiddoppelschicht hindurch bis zur extrazellulären Oberfläche hin verschoben wird (A). Alternativ ist auch eine geringe Verschiebung innerhalb der Zellmembran möglich, wenn durch das Protein in der Membran wässrige Spalten vorliegen (B) (Tombola et al, 2005).

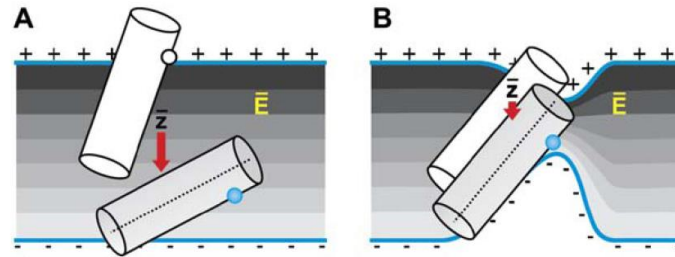


Abbildung 1.2.3-2: Modelle der S4-Bewegung

Die Lipiddoppelschicht ist grau dargestellt. Die einzelnen Grautöne zeigen unterschiedliche elektrische Potentiale in der Membran. Die weißen Zylinder stellen die Position des S4-Segments im aktivierten Ionenkanal dar, die grauen Zylinder zeigen das S4-Segment im Ruhezustand. Die vertikale Komponente der S4-Bewegung ist mit „z“ gekennzeichnet und wird mit dem roten Pfeil verdeutlicht. Die Position des obersten Arginins ist hervorgehoben (weißer bzw. blauer Kreis) (Tombola et al, 2005).

Über den S4-S5-Linker ist die Bewegung der spannungswahrnehmenden Segmente an die porenformenden Domänen gekoppelt und führt dort zu einer Konformationsänderung (Lu et al, 2002). Das 2007 von Pathak et al. erstellte Modell des geschlossenen Ionenkanals zeigt eine Verschiebung des S4-S5-Linkers nahezu parallel zur Membran (**Abb. 1.2.3-3**). Wie genau die Kopplung der Spannungswahrnehmung an die Aktivierung des Ionenkanals funktioniert ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussion.

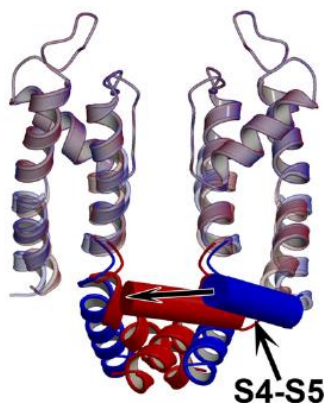


Abbildung 1.2.3-3: Kopplung des S4-S5-Linkers an die porenbildenden Segmente des Kv1.2-Ionenkanals

Dargestellt sind der S4-S5-Linker, sowie die S5- und S6-Segmente zweier einander gegenüberliegender Untereinheiten. Die S4-S5-Linker sind zylinderförmig gezeigt, die unteren Abschnitte der S6-Segmente sind ebenfalls farbig hervorgehoben. In rot ist die geschlossene Konformation, in blau die offene Konformation dargestellt (Pathak et al, 2007).

1.2.4 Die geschlossene Konformation der Kv-Kanäle

Die Kristallstruktur des rKv1.2-Ionenkanals liefert ein hervorragendes, hochauflösendes Modell der offenen Konformation des Ionenkanals, so dass die Position und Ausrichtung einzelner Aminosäurereste gut vorhergesagt werden können. Die geschlossene Konformation unterscheidet sich jedoch deutlich von der offenen Konformation, da durch die Bewegung innerhalb des Ionenkanals Segmente gegeneinander verschoben und die Helices gedreht werden. Die Lokalisation einzelner Aminosäuren und deren nähere Umgebung in der geschlossenen Konformation kann daher nicht aus dem Modell, das auf der Kristallstruktur basiert, geschlussfolgert werden. Aus diesem Grund sind viele Anstrengungen unternommen worden, um ein genaues Modell der geschlossenen Konformation zu erstellen. Mehrere Studien versuchten, aus der Zugänglichkeit der VSDs (Gandhi et al, 2003; Phillips et al, 2005; Ruta et al, 2005) oder der Porendomänen (del Camino et al, 2005; del Camino & Yellen, 2001), aus der Position des S4-Segments relativ zu interagierenden Substanzen (Chanda et al, 2005; Posson et al, 2005), der Beschaffenheit des elektrischen Feldes über der Membran (Ahern & Horn, 2005) oder durch die Charakterisierung des sogenannten „Omega-Pathways“ (Tombola et al, 2007) Rückschlüsse über die Veränderung der Position der VSDs während des Öffnens und Schließens des Ionenkanals zu gewinnen. Da über die Bewegung des S4-Segments jedoch Uneinigkeit herrscht, basieren diese Studien auf unterschiedlichen Grundannahmen.

Ausgehend von dem 2006 entwickelten Rosetta-Modell (Yarov-Yarovoy et al, 2006) und einigen weiteren Studien erstellten Pathak et al. ein neues genaueres Modell der geschlossenen Konformation des *Shaker*-Ionenkanals (Pathak et al, 2007). Dieses Modell zeigt, dass die S3- und S4-Segmente des Ionenkanals eine größere spannungswahrnehmende Bewegung ausführen, als die S1- und S2-Segmente. Dabei scheinen sich die äußeren Anteile der S3-Segmente und die S4-Segmente gleichzeitig zu bewegen und sich auch gegeneinander zu verschieben. Das S4-Segment kippt bei Depolarisation, wird nach außen bewegt und führt dabei eine Drehung um ca. 180° im Uhrzeigersinn (aus der extrazellulären Perspektive) durch. Die S1-, S2- und S3-Segmente drehen sich währenddessen im Uhrzeigersinn um das S4-Segment herum. Der S4-S5-Linker führt eine horizontale Bewegung aus und zieht dabei den N-

terminalen Abschnitt des S5-Segments mit und löst damit eine seitliche Bewegung des intrazellulären Abschnitts des S6 Segments aus. Die Aminosäure, die V516 im Kv1.5-Ionenkanal homolog ist, wird dabei deutlich von der zentralen Achse des Ionenkanals entfernt.

Die Ergebnisse früherer Studien werden von Pathak et al. berücksichtigt und um eigene Ergebnisse erweitert. So entsteht ein Modell, das die geschlossene Konformation des *Shaker*-Ionenkanals so genau wie bisher möglich beschreibt.

1.2.5 Die ILT-Mutante und das „internal cluster“

Löst eine Depolarisation der Zellmembran die Aktivierung des spannungsgesteuerten Ionenkanals aus, so werden zunächst alle vier Spannungssensoren unabhängig voneinander in die „aktivierte“ Position verschoben. Im nächsten Schritt wird dann die Pore des Ionenkanals geöffnet. Dieser letzte Schritt, wird als kooperativer Übergang („cooperative transition“) bezeichnet, da hierzu eine kooperative Konformationsänderung aller Untereinheiten nötig ist (Fedida & Hesketh, 2001).

Durch das Einfügen von den drei Mutationen V369I, I372L und S376T in das S4-Segment des *Shaker*-Ionenkanals wird dieser kooperative Übergang erschwert. Die *Shaker*-Mutante mit diesen drei Mutationen wird als ILT-Mutante bezeichnet. Die S4-Segmente der ILT-Mutante werden weiterhin in Abhängigkeit von Spannung über der Membran in die aktivierte Position verschoben. Jedoch wird der kooperative Übergang zum limitierenden Schritt bei der Aktivierung des Ionenkanals (Ledwell & Aldrich, 1999; Smith-Maxwell et al, 1998). Die ILT-Mutation führt also dazu, dass die elektromechanische Kopplung zwischen der Aktivierung der Spannungssensoren und dem Öffnen der Pore gestört wird. Die ILT-Aminosäuren sind für die Kooperation zwischen den Untereinheiten, die zur Öffnung der Pore führt, von entscheidender Bedeutung. Ein Schema der Aktivierung der ILT-Mutante im Vergleich zum *Shaker*-Ionenkanal ist in **Abb. 1.2.5-1** gezeigt.

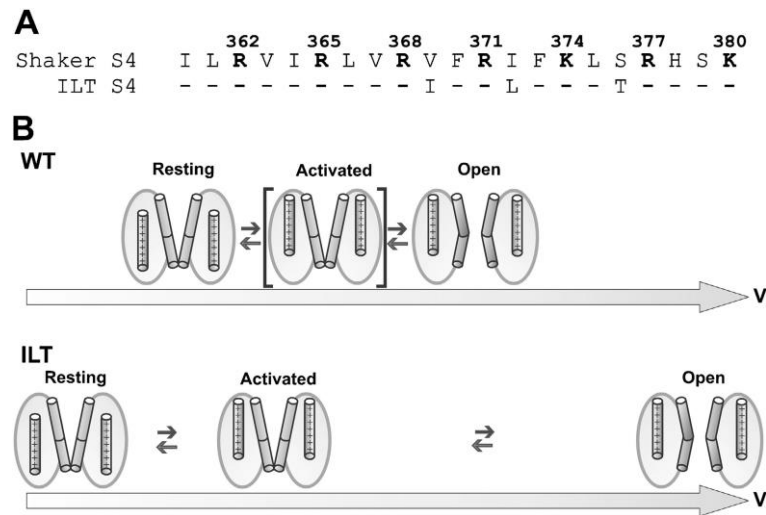


Abbildung 1.2.5-1: Die ILT-Mutation im *Shaker*-Ionenkanal

(A) Sequenzabschnitt des S4-Segments des *Shaker*-Ionenkanals und die ILT-Mutationen (B) Schema der Aktivierung in Abhängigkeit von der Spannung über der Membran (V, Pfeil) des *Shaker*-Ionenkanals (WT, oben) und der ILT-Mutante (unten) (Pathak et al, 2005).

Im Kv1.5-Ionenkanal sind folgende Aminosäuren den ILT-Aminosäuren des *Shaker*-Ionenkanals homolog: V407 entspricht V369, I410 entspricht I372 und S414 entspricht S376. Die entsprechenden Aminosäuren sind in **Abb. 1.2.5-2** hervorgehoben.

Neben diesen Aminosäuren wurde noch das „internal cluster“ im *Shaker*-Ionenkanal identifiziert, dessen Mutation einen ähnlichen Effekt wie die ILT-Mutationen erzielt (Soler-Llavina et al, 2006). Einzelne Mutationen im S5-Segment (E395W, L398W, F401A, F402A und I405W) und zwei weitere einzelne Mutationen im S6-Segment (L472W und S479W) erschweren wie die ILT-Mutationen das koordinierte Öffnen des Ionenkanals. Die S4-Segmente können sich trotz der Mutation in die aktivierte Position verschieben, jedoch ist für die Öffnung der Pore des Ionenkanals eine deutlich stärkere Depolarisation nötig. Im humanen Kv1.5-Ionenkanal sind die folgenden Aminosäuren den „internal cluster“-Aminosäuren homolog: E433 entspricht E395, L436 entspricht L398, F439 entspricht F401, F440 entspricht F402 und I443 entspricht I405 (S5)

und L510 entspricht L472 und S517 entspricht S479 (S6). Die Position dieser Aminosäuren im Kv1.5-Ionenkanal ist in der **Abb. 1.2.5-2** gezeigt.

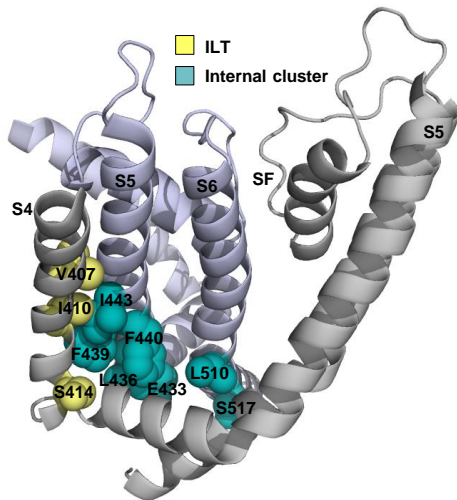


Abbildung 1.2.5-2: Position der ILT- und „internal cluster“-Aminosäuren im Kv1.5-Ionenkanal

Dargestellt sind die S4- bis S6-Segmente zweier benachbarter Kv1.5-Untereinheiten. Die Reste der ILT-Aminosäuren sind gelb, die der „internal cluster“-Aminosäuren blau gezeigt, SF = Selektivitätsfilter.

1.2.6 Laterale Öffnungen in der Kristallstruktur des NavAb-Ionenkanals

2011 konnte der spannungsgesteuerte Natrium-Ionenkanal aus *Arcobacter butzleri* (NavAb) kristallisiert werden (Payandeh et al, 2011). Die Kristallstruktur des NavAb zeigt den aktivierten, geschlossenen Zustand. Das heißt, dass die Spannungssensoren sich in einer aktivierten Position befinden, jedoch die Pore nicht geöffnet ist. In diesem Zustand wurden in der Kristallstruktur laterale Öffnungen entdeckt, die sich seitlich von der zentralen Pore befinden (**Abb. 1.2.6-1**). Diese lateralen Fenster verbinden die Membran und das Lumen der geschlossenen Pore des Ionenkanals und ermöglichen die Passage von kleinen, hydrophoben Molekülen. Diese erreichen so die Aminosäuren, die die Bindungsstelle in der zentralen Ionenkanalpore darstellen: T206, M209 und V213 (hervorgehoben in **Abb. 1.2.6-1**). Die Studie von Payandeh et al zeigt, dass Lipide diese lateralen Fenster passieren und so in das Lumen der Pore vordringen, wo sie die Pore verstopfen. Die Passage von Ionen ist verhindert, so dass der Ionenkanal blockiert ist. In der Kristallstruktur des rKv1.2-Ionenkanals sind diese lateralen Fenster nicht sichtbar (Long et al, 2005). Dies könnte daran liegen, dass der rKv1.2-Ionenkanal im geschlossenen, nicht aktivierten Zustand kristallisiert wurde. Die lateralen Fenster könnten somit abhängig vom Zustand des Ionenkanals ihre Größe ändern und nur in bestimmten Konformationen ihre volle Größe annehmen. Es ist auch möglich,

dass Unterschiede zwischen Natrium- und Kalium-Kanälen für die unterschiedliche Größe der lateralen Öffnungen mitverantwortlich sind.

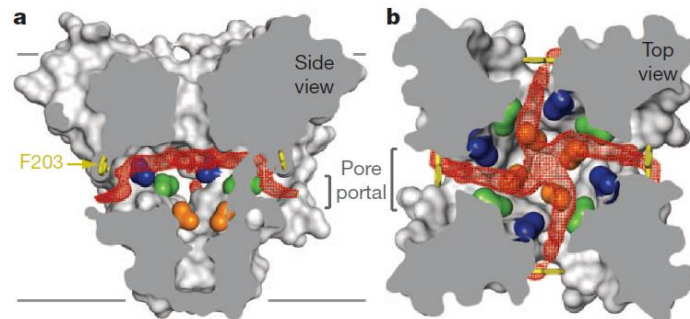


Abbildung 1.2.6-1: Laterale Fenster bilden eine Verbindung zwischen Membran und der zentralen Pore

Die lateralen Fenster („pore portal“, rot) in (a) der Seitenansicht und (b) aus extrazellulärer Perspektive auf Höhe des Selektivitätsfilters des Modells. Die Reste der Aminosäuren T206 (blau), M209 (grün) und V213 (orange) sind farblich hervorgehoben. Markiert ist außerdem F203 (gelb) (Payandeh et al, 2011).

1.3 Die Modulation von Kv-Kanälen

1.3.1 Die Inhibition und Regulation von Kv-Kanälen

Substanzen, die Kalium-Kanäle inhibieren, nehmen einen entscheidenden Einfluss auf die Dauer der Aktionspotentiale und damit auf deren Frequenz. Diese Substanzen sind von klinischer Bedeutung, da sie für die Behandlung verschiedenster Erkrankungen in Frage kommen.

Die Mitglieder der Kv4-Familie gelten als mögliche Zielmoleküle zur Behandlung des Brugada-Syndroms (Marquez et al, 2007), einer vererbaren Krankheit, die das hohe Risiko eines plötzlichen Herztods birgt. Auch gelten Substanzen, die Kv3-Kanäle inhibieren, als mögliche Wirkstoffe in der Therapie unterschiedlicher neurodegenerativer Erkrankungen (Choi & Abbott, 2007). Die Mitglieder der Kv1-Familie sind vielversprechende Angriffspunkte in der Behandlung von neurologischen Erkrankungen wie multipler Sklerose, Schlaganfall und Rückenmarksverletzungen (Beeton et al, 2001; Beraud et al,

2006; Potter et al, 1998; Schwid et al, 1997). Der Kv1.3-Ionenkanal spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion humaner T-Zellen. Selektive Inhibitoren des Kv1.3-Ionenkanals könnten als Immunomodulatoren Patienten helfen, die an multipler Sklerose erkrankt sind (Vennekamp et al, 2004). Die entscheidende Rolle des Kv1.5-Ionenkanals bei der Repolarisation des menschlichen Atriums weist darauf hin, dass sich ein selektiver Inhibitor zur Behandlung von Arrhythmien eignen könnte. Bereits charakterisierte Substanzen, die den Kv1.5-Ionenkanal inhibieren, sind AVE0118 und S0100176. Die Interaktion dieser Wirkstoffe mit dem Kv1.5-Ionenkanal ist bereits systematisch untersucht worden (Decher et al, 2006; Decher et al, 2004).

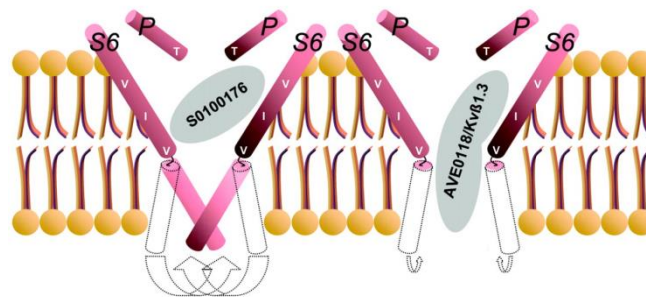


Abbildung 1.3.1-1: Interaktion des Kv1.5-Ionenkanals mit S0100176 oder AVE0118

Die Abbildung zeigt die S6-Segmente und die Porenschleifen (P) von zwei einander gegenüberliegenden Kv1.5-Untereinheiten (pink). In rot-orange ist die Lipiddoppelschicht der Zelle dargestellt. Mittels der weißen Rechtecke ist dargestellt, wie sich das S6-Segment während der Aktivierung bzw. Deaktivierung bewegt. Die Unterbrechung im S6-Segment stellt die Prolin-X-Prolin-Sequenz dar. Die Inhibitoren S0100176 und AVE0118 befinden sich in der zentralen Pore des Ionenkanals (Decher et al, 2006). Die Interaktion mit AVE0118 verhindert das Deaktivieren des Ionenkanals (Decher et al, 2006).

Beide Substanzen interagieren mit der zentralen Ionenkanalpore des Kv1.5-Ionenkanals. AVE0118-Moleküle interagieren mit Aminosäuren oberhalb und unterhalb der Prolin-X-Prolin-Sequenz. Die Deaktivierung des Ionenkanals führt zu einer Konformationsänderung der S6-Segmente, die eine Veränderung des Winkels, der durch die Prolin-X-Prolin-Sequenz hervorgerufen wird, herbeiführen. Durch die Interaktion mit AVE0118 kann diese Konformationsänderung nicht mehr ausgeführt werden. Der Ionenkanal kann

daher trotz Repolarisierung der Membran nicht schließen. Dieser Vorgang wird als „foot in the door“ bezeichnet, da die AVE0118-Moleküle wie ein Fuß in der Tür den Schließvorgang während der Deaktivierung unterbinden. Im Gegensatz dazu interagiert S0100176 eher mit dem oberen Teil der zentralen Ionenkanalpore in der Nähe des Selektivitätsfilters (**Abb. 1.3.1-1**) (Decher et al, 2006).

Ionenkanäle können durch verschiedene Substanzen blockiert werden. Es sind jedoch auch Aktivatoren von Ionenkanälen bekannt (Bentzen et al, 2007; Casis et al, 2006; Hansen et al, 2006; Kang et al, 2005; Salata et al, 1998; Zhou et al, 2005). Im Gegensatz zu den Inhibitoren sind der genaue Mechanismus der Aktivierung und die exakte Bindungsstelle dieser Substanzen noch unbekannt. Auch die Interaktion mit den Kv β -Untereinheiten ist ein wichtiger Regulationsmechanismus und somit Gegenstand aktueller Forschung. Die Bindungsstelle des Kv β 1.3-Moleküls mit dem Kv1.5-Ionenkanal ist kürzlich identifiziert worden. Diese Kv β -Untereinheit kann eine Haarnadel-ähnliche Konformation annehmen und so die zentrale Ionenkanalpore erreichen. Dort interagiert sie mit Aminosäuren der S6-Segmente und der Porenschleifen, die in die zentrale Ionenkanalpore gerichtet sind (Decher et al, 2008; Decher et al, 2005). Außerdem verhinderte die Mutation der Aminosäure L510, deren Rest sich auf der der Pore abgewandten Seite des S6-Segments befindet, eine Inaktivierung durch Kv β 1.3-Moleküle (Decher et al, 2005).

1.3.2 Die klassische Medikamenten-Bindungsstelle

Die klassische Medikamenten-Bindungsstelle sowie die Bindungsstelle der Inaktivierungspartikel befindet sich an konservierten Positionen in der zentralen Ionenkanalpore und im Bereich des Selektivitätsfilters. Auch in Natrium- und Kalzium-Kanälen (Hockerman et al, 2000; Snyders & Yeola, 1995) und in verschiedenen weiteren Kalium-Ionenkanälen ist die Bindungsstelle an den gleichen konservierten Positionen lokalisiert (Decher et al, 2004; Hanner et al, 2001; Mitcheson et al, 2000). Diese Ionenkanäle haben alle die wassergefüllte zentrale Ionenkanalpore und die hydrophoben Aminosäuren gemeinsam, die in diese Pore gerichtet sind. Die hERG-Ionenkanäle, die zu den spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen zählen, stellen eine Ausnahme dar. Die

zentrale Ionenkanalpore weist zwei aromatische Aminosäuren an den Positionen Y652 und F656 auf, die in die Pore gerichtet sind und die Medikamenten-Bindungsstelle des Ionenkanals bilden. In den zentralen Ionenkanalporen der anderen Ionenkanäle liegen an den homologen Positionen stattdessen Valine oder Isoleuzine vor. Daher kann der hERG-Ionenkanal auch durch eine elektrostatische Wechselwirkung mit den interagierenden Substanzen moduliert werden (Mitcheson et al, 2000). Auch die Struktur der zentralen Pore der hERG-Ionenkanäle weicht von der der homologen Ionenkanäle ab, da die porenbildenden Segmente keine Prolin-X-Prolin-Sequenz beinhalten und somit auch die charakteristische Biegung der entsprechenden Segmente nicht vorliegt. Der hERG-Ionenkanal weist stattdessen die Sequenz Isoleuzin-Phenylalanin-Glutamin auf.

Die Kv-Kanäle sind auf Grund der konservierten Bindungsstelle pharmakologisch nicht voneinander zu unterscheiden. Lediglich der hERG-Ionenkanal weist durch seine beschriebenen Besonderheiten andere pharmakologische Eigenschaften auf. Werden die Sequenzen der Porenschleifen mit denen der S6-Segmente der Kv-Kanäle verglichen, so fällt auf, dass innerhalb dieser Familie auch die Aminosäuren an den konservierten Positionen identisch sind.

Die klassische Bindungsstelle des Kv1.5-Ionenkanals besteht aus den Aminosäuren I508, V512 und V516, deren Reste in die zentrale Pore gerichtet sind. Neben den bereits erwähnten Studien zur Bindungsstelle der Substanzen S0100176, AVE0118 und dem Kv β -1.3-Molekül ist diese klassische Bindungsstelle auch für die Substanzen Icagen-4, MSD-D und S9947 (Strutz-Seeböhm et al, 2007) identifiziert worden. An der Bindungsstelle sind auch die Aminosäuren T479 und T480 beteiligt, die in der Porenschleife so lokalisiert sind, dass ihre Reste in den oberen Bereich der zentralen Pore ragen (Decher et al, 2006; Decher et al, 2004; Eldstrom et al, 2007; Strutz-Seeböhm et al, 2007).

Die Aminosäuren I508 und V512 der klassischen Bindungsstelle des Kv1.5-Ionenkanals sind den Aminosäuren Y652 und F656 der Bindungsstelle des hERG-Ionenkanals (Decher et al, 2004), der entsprechenden Bindungsstelle im KCNQ1-Ionenkanal (Seeböhm et al, 2003) und im Kv1.3-Ionenkanal (Hanner et

al, 2001) homolog. Diese Studien weisen auf eine konservierte klassische Bindungsstelle für unterschiedliche Substanzen in den verschiedenen Kalium-Kanälen hin (Decher et al, 2004). Die starke Konservierung erschwert die Entwicklung von spezifischen Ionenkanalblockern. Selektive Kv-Kanal-Inhibitoren müssten an eine weitere Bindungsstelle binden können, die außerhalb der zentralen Pore liegt. Die einzige bekannte Alternative zu der Bindung an die klassische Medikamenten-Bindungsstelle ist bisher jedoch nur die Bindung von Peptidtoxinen an nicht konservierte extrazelluläre Bereiche des Ionenkanals (MacKinnon et al, 1990; Swartz & MacKinnon, 1997a; Swartz & MacKinnon, 1997b). Toxine können zwar zwischen den Ionenkanälen unterscheiden, sie sind jedoch aufgrund ihrer Größe und des schnellen Metabolismus als Therapeutika weniger geeignet.

1.3.3 Bupivacain

Bupivacain ist ein langwirksames Lokalanästhetikum vom Amidtyp. Es inhibiert spannungsgesteuerte Natrium-Kanäle, aber auch Kalium- und Kalzium-Kanäle. Bupivacain kann eine kardiotoxische Wirkung haben (Castle, 1990; Clarkson & Hondeghem, 1985; Gonzalez et al, 2002a; Lipka et al, 1998; Valenzuela et al, 1995). Es verringert die Kontraktilität des Herzens und die Geschwindigkeit der Erregungsleitung und erhöht sowohl den arteriellen Blutdruck als auch die Herzfrequenz. Weiterhin kann es Arrhythmien oder ein LQT-Syndrom hervorrufen (Clarkson & Hondeghem, 1985; Kotelko et al, 1984; Sanchez-Chapula, 1988; Scott et al, 1989). Die Inhibition durch Bupivacain ist stereoselektiv. Das R-Enantiomer ist dabei gegenüber dem S-Enantiomer siebenfach potenter und löst auch den Großteil der kardiotoxischen Effekte aus (Nau et al, 2000). Es wird angenommen, dass die Konformation des R-Enantiomers zu einer optimalen Interaktion mit der Bupivacain-Bindungsstelle im Kv1.5-Ionenkanal führt (Valenzuela et al, 1995).

Die Bindungsstelle der Lokalanästhetika im Kv1.5-Ionenkanal soll in der zentralen Pore und der Porenschleife lokalisiert sein. Als Aminosäuren, die an der Bindungsstelle der Lokalanästhetika Bupivacain und Benzocain beteiligt sind, wurden T479, T507, L510 und V514 identifiziert (Caballero et al, 2002; Franqueza et al, 1997). Diese Aminosäuren sollen auch für die

Stereoselektivität Bupivacains verantwortlich sein (Caballero et al, 2002; Franqueza et al, 1997). Die Bindungsstelle ist bisher jedoch nicht mit systematischen Ansätzen untersucht worden. Außerdem liegt bereits die Kristallstruktur des rKv1.2-Ionenkanals vor (Long et al, 2005), die zeigt, dass die Reste von T507, L510 und V514 sich auf der der Pore abgewandten Seite des S6-Segments befinden und in Richtung des S4-S5-Linkers der benachbarten Untereinheit gerichtet sind. Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich die Bupivacain-Bindungsstelle systematisch analysiert und gezeigt, dass die Aminosäuren T480, V512 und V516, deren Reste tatsächlich in die zentrale Ionenkanalpore gerichtet sind, sowie I502, deren Rest in die lateralen Fenster zeigt und L510, deren Rest auf der der Pore abgewandten Seite des S6-Segments lokalisiert ist und außerdem Aminosäuren im S5-Segment für die Interaktion mit Bupivacain von Bedeutung sind (Marzian, 2009).

1.3.4 Psora-4

Mit 5-(4-phenylbutoxy)psoralen (Psora-4) wurde eine Substanz beschrieben, die Kv1-spezifisch wirkt und eine besonders hohe Affinität zum Kv1.3-Kanal aufweist (Vennekamp et al, 2004).

Ein Inhibitor des Kv1.3-Ionenkanals könnte sich zur Therapie von multipler Sklerose eignen. Multiple Sklerose ist eine Autoimmunerkrankung, bei der die Myelinscheiden der Axone durch das Immunsystem angegriffen werden. Als myelin-reaktive T-Zellen sind die Kv1.3-abhängigen T_{EM}-Zellen identifiziert worden (Wulff et al, 2003). Im aktivierten Zustand liegen deutlich mehr Kv1.3-Ionenkanäle in der Zellmembran dieses Zelltyps vor, so dass eine selektive Inhibition des Kv1.3-Ionenkanals zur Behandlung von multipler Sklerose genutzt werden könnte (**Abb1.3.4-1**).

Psora-4 blockiert den Kv1.3-Ionenkanal hochpotent und konzentrationsabhängig (**Abb. 1.3.4-1**). Die Interaktion ist irreversibel, was die Autoren der Studie auf die hohe Affinität und die Lipophilie der Psora-4-Moleküle zurückführen. Außerdem scheint Psora-4 an die inaktive Konformation des Ionenkanals zu binden. Gegenüber den anderen Mitgliedern der Kv1-Familie, dem Kv1.1-, Kv1.2- Kv1.4- und Kv1.7-Ionenkanal, weist Psora-4 in der Studie von Vennekamp et al. eine 16-70-fach höhere Potenz für den Kv1.3-

Ionenkanal auf. Der einzige Ionenkanal, der laut dieser Studie außer dem Kv1.3-Ionenkanal potent blockiert wird, ist der Kv1.5-Ionenkanal. Psora-4 kann Mitglieder anderer Ionenkanalfamilien nicht blockieren. Getestet wurde die Inhibition durch Psora-4 an weiteren Kalium-Kanälen, wie dem hERG-Ionenkanal und dem Kv3.1-Ionenkanal. Psora-4 blockiert außerdem den Kv1.3-Ionenkanal 300-fach potenter als den Na_v1.2-Ionenkanal.

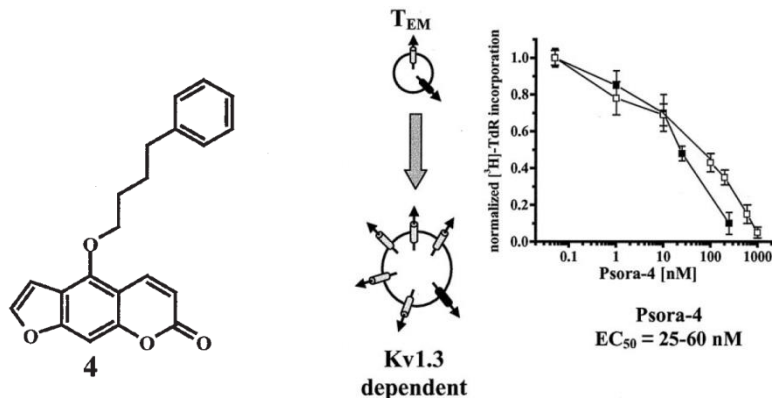


Abbildung 1.3.4-1: Der Effekt von Psora-4 auf die Kv1.3-abhängigen T_{EM}-Zellen

Links ist die chemische Struktur eines Psora-4-Moleküls gezeigt. Im mittleren Teil der Abbildung sind die Aktivierung einer T_{EM}-Zelle und die daraus resultierende Kv1.3-Abhängigkeit gezeigt. Rechts ist der Effekt der Substanz Psora-4 auf die Proliferation dieses Zelltyps dargestellt. Durch Stimulation ist mit der Proliferation humaner T_{EM}-Zellen (schwarze Quadrate) und entsprechenden Zellen der Ratte (weiße Quadrate) zu rechnen. Die Rate der Zellteilungen kann durch Zugabe markierter Thymidine und durch Messung der Aufnahme dieser Thymidine in die sich teilenden Zellen ermittelt werden (y-Achse). Der ermittelte EC₅₀-Wert liegt bei 25-60 nM Psora-4 und entspricht der Psora-4-Konzentration, die zu einer 50 %igen Verminderung der Proliferation führt (Vennekamp et al, 2004).

1.3.5 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Die eukaryotischen Zellen werden von einer Lipiddoppelschicht umgeben, die aus verschiedenen Phospholipiden aufgebaut ist. Hierbei werden Sphingolipide und Phosphoglyceride unterschieden. Phosphoglyceride bestehen aus Glycerin, welches mit zwei Fettsäuren verestert ist. Eine Phosphatgruppe ist an die dritte OH-Gruppe des Glycerins gebunden.

PUFAs weisen zwei oder mehr Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette auf. Sie werden in wichtigen neuronalen Signalwegen freigesetzt und zur Synthese von Botenstoffen, wie Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen verwendet. Sie nehmen damit Einfluss auf eine Vielzahl von physiologischen Prozessen. Arachidonsäure (Aa) ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure, die aus der essentiellen Linolsäure synthetisiert oder über die Nahrung aufgenommen werden kann. Aa ist häufig Bestandteil von Lipiden der Zellmembran und kann durch die Phospholipase 2 freigesetzt werden (Farooqui & Horrocks).

PUFAs sind Bestandteil von Zellmembranen und somit Teil der Umgebung der Ionenkanäle. PUFAs modulieren spannungsgesteuerte Natrium-, Kalzium- und Kalium-Kanäle (Boland & Drzewiecki, 2008; Chesnoy-Marchais & Fritsch, 1994; Shimada & Somlyo, 1992; Xiao et al, 1995) und somit die neuronale und kardiale Erregungsweiterleitung. Nach Aktivierung von Phospholipasen sind die physiologischen Konzentrationen der PUFAs ausreichend, um Kv-Kanäle zu beeinflussen (Farooqui & Horrocks, 2006; Meves, 2008; Oliver et al, 2004). Die Interaktion von PUFAs mit spannungsgesteuerten Ionenkanälen ist von großem Interesse, da PUFAs neuroprotektiv wirken (Lauritzen et al, 2000; Xiao & Li, 1999) und zur Therapie von Epilepsie (Lefevre & Aronson, 2000; Xu et al, 2008) und kardialen Arrhythmien (Leaf et al, 2003) eingesetzt werden können.

Der Mechanismus der Modulation von spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen durch PUFAs, wie zum Beispiel Aa, ist Gegenstand aktueller Forschung. Die Modulation umfasst mehrere Aspekte: (1) die Spannungsabhängigkeit der Kv-Kanäle wird verändert, (2) der Peakstrom (Stromamplitude zu Beginn der Depolarisation, „peak current amplitude“) wird erhöht und (3) die Kv-Kanäle werden inhibiert.

Als mögliche Mechanismen werden Effekte auf die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran (Leifert et al, 1999; Lundbaek, 2008), lipoelektrische Modifikation (Borjesson et al, 2008; Borjesson et al; Börjesson et al, 2010) und eine direkte Interaktion mit den Ionenkanälen (Honore et al, 1994; Kang & Leaf, 1996; Mackay & Mochly-Rosen, 2001) diskutiert. Es wurde bereits gezeigt, dass PUFAs Konformationsänderungen im Selektivitätsfilter hervorrufen, die zu einer schnellen Inaktivierung führen, indem sie

möglicherweise in der Nähe des Selektivitätsfilters an den Ionenkanal binden oder die Eigenschaften der Zellmembran verändern (Oliver et al, 2004). Eine weitere Studie zeigt, dass es eine PUFA-Interaktionsstelle im oberen Bereich der spannungswahnehmenden Segmente gibt, die das Öffnen und Schließen des Ionenkanals beeinflusst (Börjesson & Elinder, 2011). Auch konnte gezeigt werden, dass die Ladung der PUFAs und die positiv geladenen Aminosäuren des Spannungssensors zu elektrostatischen Wechselwirkungen führen und es so zu einer Veränderung der Spannungsabhängigkeit des Ionenkanals und somit zu einer veränderten Erregbarkeit der Zelle kommt. Die Richtung der Veränderung der Spannungsabhängigkeit ist von der Ladung der PUFA abhängig. Positiv geladene PUFAs erschweren die Bewegung des Spannungssensors und führen somit zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit in positive Richtung, da eine stärkere Depolarisation zum Öffnen des Ionenkanals nötig ist. Negativ geladene PUFAs vereinfachen die Bewegung des Spannungssensors und somit das Öffnen und bewirken eine Verschiebung zu negativeren Potentialen (Börjesson et al, 2010) (**Abb. 1.3.5-1**).

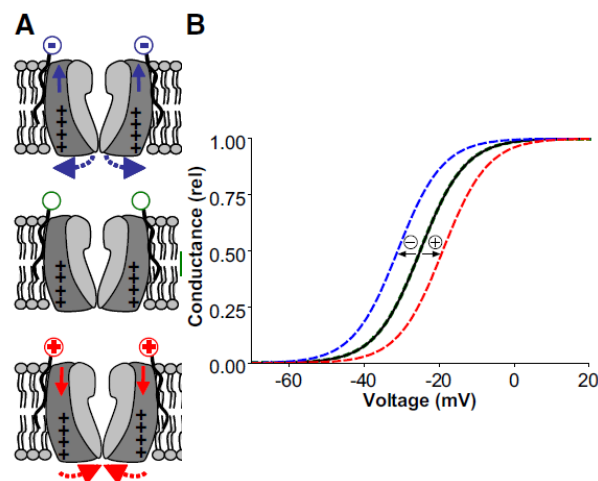


Abbildung 1.3.5-1: Die Interaktion eines spannungsgesteuerten Kalium-Kanals mit unterschiedlich geladenen Lipiden

(A) Skizzen einer Interaktion zwischen einem spannungsgesteuerten Kalium-Kanal und negativ geladenen (blau, oben), neutralen (grün, Mitte) oder positiv geladenen (rot, unten) PUFAs. (B) Verschiebung der Spannungsabhängigkeit durch Applikation entsprechender PUFAs. Farbkodierung wie in (A) (Börjesson et al, 2010)

Die Effekte auf die Spannungsabhängigkeit und die Inaktivierungs-ähnliche Inhibition der Kv-Kanäle durch PUFAs werden durch zwei unabhängige Mechanismen verursacht (Börjesson et al, 2010). Den unabhängigen Mechanismen könnte die Interaktion mit PUFAs an unterschiedlichen Bindungsstellen zu Grunde liegen.

1.4 Zielsetzung der Dissertation

Im Rahmen dieser Dissertation befasste ich mich mit der Pharmakologie der Kv1-Ionenkanäle. Diese Arbeit sollte die Interaktion des Kv1.5-Ionenkanals mit den Substanzen Psora-4 und Aa beschreiben, die Bindungsstellen identifizieren und, wenn möglich, den Inhibitionsmechanismus ermitteln. Hierzu wurden elektrophysiologische und molekularbiologische Techniken angewandt.

Die Position der Bindungsstelle für Medikamente ist innerhalb der verschiedenen Ionenkanal-Familien konserviert, wodurch die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren nicht möglich scheint. Mit Psora-4 wurde jedoch eine Substanz beschrieben, die Kv1-spezifisch wirkt (Vennekamp et al, 2004). Ein Ziel meines Forschungsvorhabens war es, die Interaktion von Psora-4 mit Kv1-Kanälen zu charakterisieren und die molekularen Determinanten dieses überraschenden Kv1-spezifischen Blocks aufzuklären. Besonderes Interesse galt dabei der Psora-4-Bindungsstelle und dem zugrunde liegenden Inhibitionsmechanismus.

Im Rahmen der Doktorarbeit sollte dazu eine systematische Analyse der Psora-4-Bindungsstelle durchgeführt werden. Da die klassische Medikamenten-Bindungsstelle in der zentralen Ionenkanalpore lokalisiert ist, sollten zunächst die S6-Segmente und 2 Aminosäuren der Porenschleifen, die den oberen Teil der zentralen Kavität auskleiden, als mögliche Bindungsstellen untersucht werden. Hierzu sollten Alanin-Mutanten des S6-Segments, die mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt worden waren, im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten mit der TEVC-Technik untersucht werden. Die Ergebnisse sollten erste Hinweise für die Lokalisation der gesamten Bindungsstelle im Kv1.5-Ionenkanal ergeben. Im folgenden Schritt sollten dann entsprechende weitere Abschnitte des Kv1.5-Ionenkanals,

ebenfalls mittels eines Alanin-Scans, untersucht werden. Molekulardynamische Simulationen der Bindung von Psora-4 an den Kv1.5-Ionenkanal könnten dann weitere Hinweise auf den Inhibitionsmechanismus geben, der dann weitergehend erforscht werden sollte.

Mein Interesse galt außerdem der Bindungsstelle von PUFAs in Kv1-Ionenkanälen. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe, an der ich beteiligt war, zeigt, dass diese ebenfalls an die klassische Medikamenten-Bindungsstelle in der zentralen Ionenkanalpore binden und so den offenen Ionenkanal blockieren (Decher et al, 2010). Die Studie, die die Bindungsstellen und den Inhibitionsmechanismus von Psora-4 in Kv1-Kanälen behandelt (Marzian et al, 2013), warf jedoch die Frage auf, ob auch PUFAs noch an eine oder mehrere andere Bindungsstellen binden und ob eventuell bestimmte Bestandteile der Inhibition der Interaktion der PUFAs mit bestimmten Segmenten des Ionenkanals zuzuordnen sind. Um diese Fragen zu beantworten, sollte ein deutlich erweiterter Alanin-Scan mit der PUFA Aa durchgeführt werden, der die Segmente umfasste, für die sich in der Studie zur Psora-4-Bindungsstelle oder in der Literatur Hinweise auf eine Interaktion mit Aa finden ließen. Da die Inhibition des Kv1.5-Ionenkanals durch PUFAs mehrere Teileffekte umfasst, sollten mehrere Parameter ausgewertet werden, um veränderte Effekte möglichst genau beschreiben zu können. Eine Gesamtanalyse der Daten soll die wahrscheinlich äußerst komplexe und vielseitige Interaktion von PUFAs mit Kv1-Ionenkanälen beschreiben.

2 Materialien/Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Fermentas, New England Biolabs, Roth, Biorad, Sigma, Roche, Invitrogen und Peqlab bezogen.

2.1.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten: Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten sind 1,5 %ige Agarosegele verwendet worden. Diese wurden durch Mischen der peqGold Universal Agarose der Firma Peqlab mit dem TAE-Puffer [40mM Tris, 40mM Essigsäure, 1mM EDTA] hergestellt. Das Gemisch wurde kurz aufgekocht und pro 35 mL wurde ein Tropfen einer 0,025 %igen Ethidiumbromidlösung zugegeben.

Die Elektrophoresekammern sind mit 1x TAE-Puffer gefüllt worden. Der verwendete Marker war λ DNA/Eco 471 (Avall) der Firma Fermentas. Den DNA-Proben wurde 6x DNA Loading Dye der Firma Fermentas zugesetzt. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine Spannung von 100-110 V für eine Dauer von 15 - 50 Minuten angelegt. Mittels eines UV-Transiluminators wurde die aufgetrennte DNA detektiert.

2.1.3 Mutageneseprimer

Die Primer für die zielgerichtete Mutagenese wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Um zielgerichtet eine Mutation in ein Plasmid einzuführen, sind die Mutageneseprimer so gewählt, dass sie sich über die zu mutierende Sequenz anlagern und die gewünschte Mutation enthalten. Die Mutageneseprimer zur Herstellung der Kv1.5-Ionenkanalmutanten hatten eine Länge von 24 Basen und waren komplementär zueinander. Zur Herstellung der Kv2.1-Ionenkanalmutanten wurde neben den üblichen 24 Basen-Primern ein 40 Basen-Primer verwendet, um in einem Schritt die dreifache Kv2.1-Mutante L291F/M295I/I299L zu generieren. Um zu gewährleisten, dass die

Mutageneseprimer möglichst gut an die zu mutierende Sequenz binden, damit die DNA-Polymerase gut an den Primer anknüpfen und entsprechend eine erfolgreiche Mutagenese durchgeführt werden kann, sollten die 3'-Enden aus den Basen Guanin oder Cytosin bestehen.

2.1.4 Mutagenese

Zur zielgerichteten Substitution ausgewählter Basen im Plasmid wurden die folgenden Volumina aus dem Mutagenese Kit der Firma Stratagen gemischt:

0,6 µL	cDNA [10 ng/µL]
0,45 µL	Mutagenese-Primer [10 pmol/µL]
1,2 µL	DMSO
1,5 µL	10xPuffer
0,3 µL	dNTP Mix
0,3 µL	TurboTaq
10,2 µL	Wasser

Zur Durchführung der zielgerichteten Mutagenese wurde die PCR-Maschine MJ Mini der Firma Biorad verwendet. Die PCR-Maschine stellte die Temperatur für 30 Minuten auf 96° C, für 1 Minute auf 55° C und für 14 Minuten auf 68° C ein. Für eine Mutagenese-Reaktion durchlief das Gerät 16 dieser Zyklen.

Um die methylierte DNA der *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien des Stammes DH5α abzubauen, die bei der Mutagenese als Matrize dient, wird anschließend der *Dpn1*-Verdau durchgeführt. Hierbei werden 0,3 µL *Dpn1* zu dem oben beschriebenen Ansatz pipettiert und für 1 Stunde bei 37° C inkubiert.

2.1.5 Bakterienstämme

Chemisch kompetente *E. coli* Bakterien des Stammes DH5α (Genotyp: F⁻ Φ80*lacZ*ΔM15Δ (*lacZYA-argF*) U169*deoRrecA1endA1hsdR17* (r_k⁻,m_k⁺)

*phoA**supE44**thi1**gyrA96**relA1* λ^-) von der Firma Invitrogen sind zur Transformation von DNA verwendet. Sie werden bei -80° C gelagert.

2.1.6 Anzuchtverfahren und Medien der *Escherichia coli* Bakterien des Stammes DH5 α

Das LB-Medium ist mit LB-Medium der Firma Roth, die LB-Platten mit LB-Agar der Firma Roth nach Herstellerangaben angesetzt worden. Zur Anzucht der *E. coli* Bakterien des Stammes DH5 α in LB-Medium sind diese über Nacht bei 37° C im Schüttler und zur Anzucht auf LB-Platten über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert worden.

Ampicillin wurde zur Selektion der Bakterien mit einer Endkonzentration von 100 μ g/mL verwendet.

2.1.7 Aufbewahrung der Bakterien: Glycerolstocks

Nach einer Inkubation der Bakterien in LB-Medium bei 37° C über Nacht im Schüttler wurde zu 500 μ L des LB-Mediums mit den Bakterien noch 500 μ L Glycerin zugegeben und vermischt. Die Endkonzentration des Glycerins betrug 50 %. Die Glycerolstocks dienen der längeren Aufbewahrung der Bakterien und wurden bei -80°C gelagert.

2.1.8 Transformation

Die chemisch kompetenten *E. coli* Bakterien des Stammes DH5 α wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Zu 80 μ L dieser Zellen wurden 8 μ L des zu transformierenden Mutagenese-Produkts bzw. 10 μ L der zu transformierenden Ligation zugegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurde der Reaktionsansatz für 2 Minuten bei 37° C und daraufhin noch einmal 1 Minute auf Eis gelagert. Nach der anschließenden Zugabe von 900 μ L LB-Medium inkubierten die Zellen 1 Stunde im Schüttler bei 37° C.

Nach dieser Inkubation wurde 4 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und nachdem das Pellet im restlichen Medium

resuspendiert worden war, auf LBA-Platten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

2.1.9 Retransformation

Zur Durchführung einer Retransformation wurden 50 µL der chemisch kompetenten *E. coli* Bakterien des Stammes DH5α auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 µL der zu transformierenden DNA zupipettiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt ist das Gemisch für 5 Minuten bei 37° C im Schüttler inkubiert und daraufhin auf LBA-Platten ausplattiert worden. Diese inkubierten bei 37° C über Nacht im Brutschrank.

2.1.10 Plasmidisolierung aus Bakterien: Minipräparation

Zur Anzucht der *E. coli* Bakterien des Stammes DH5α ist eine 3 mL Übernachtkultur in LBA-Medium, der zuvor auf die LBA-Platten ausplattierten Proben, verwendet worden. Die Plasmidisolierung wurde mit dem Plasmid Mini Kit I von Omega bio-tek nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.1.11 Plasmidisolierung aus Bakterien: Midipräparation

Zur Plasmidisolierung im größeren Maßstab wurde eine 50 mL Übernachtkultur der *E. coli* Bakterien des Stammes DH5α in LBA-Medium angesetzt. Das CompactPrep Plasmid Midi Kit (25) der Firma Qiagen ist dann nach Herstellerangaben verwendet worden.

2.1.12 Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde das Spektrometer Gene Quant RNA/DNA Calculator der Firma Pharmacia Biotech verwendet. Es wurde die Lichtadsorption bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt.

2.1.13 Sequenzierungsprimer

Alle verwendeten Sequenzierungsprimer wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die Sequenzierungsprimer wurden so ausgewählt, dass sie sich vor der Schnittstelle des Restriktionsenzym, das später zur Subklonierung benutzt wird, an die zu sequenzierende Sequenz anlagern. Damit wird überprüft, ob die gewünschte Mutation in das Konstrukt eingefügt wurde. Desweiteren wird ausgeschlossen, dass sich weitere unerwünschte Mutationen in der Sequenz zwischen den Restriktionsschnittstellen befinden, da diese später subkloniert werden soll.

2.1.14 Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab durchgeführt. Zur Analyse der Sequenzen ist das Programm Sequencher (Gene Codes) verwendet worden.

2.1.15 Restriktionsverdau mutierter DNA-Abschnitte

Um auszuschließen, dass in die Plasmide durch die Mutagenese unerwünschte Mutationen eingefügt wurden, wird der Abschnitt des Ionenkanals, in dem die gewünschte Mutation vorliegt, mittels zweier Restriktionsenzyme herausgeschnitten und in den WT-Hintergrund eingefügt. Die gewählten Restriktionsenzyme dürfen das Konstrukt nur jeweils genau einmal schneiden.

Die Ionenkanalmutanten zur Durchführung eines Alanin-Scans des S6-Segments G497A-V516A waren im Labor der AG Decher bereits vorhanden und standen mir so zur Verfügung. Zur Herstellung der weiteren Kv1.5-Ionenkanalmutanten sind folgende Restriktionsenzyme und Puffer verwendet worden:

Segment	Mutanten	Restriktions- enzyme	Puffer	Firma
S3-S4-Linker	Q388A-S395A	<i>BsaA1/Mlu1</i>	NEB3	New England Biolabs
S4	L396A-V405A	<i>BsaA1/Mlu1</i>	NEB3	New England Biolabs
	R406A-R418A	<i>Mlu1/BspT1</i>	Puffer O	Fermentas
	G419A-Q428A	<i>Mlu1/BspT1</i>	Puffer O	Fermentas
S4-S5-Linker	G419A-Q428A	<i>Mlu1/BspT1</i>	Puffer O	Fermentas
S5	E433A-E456A	<i>Mlu1/BspT1</i>	Puffer O	Fermentas
Porenschleifen	A457V-M478A	<i>Mlu1/BspT1</i>	Puffer O	Fermentas
	D485A-V491A	<i>Mlu1/BspT1</i>	Puffer O	Fermentas
	G492A-V496A	<i>Mlu1/BspT1</i>	Puffer O	Fermentas
S6	A501I, A501L	<i>Mlu1/BspT1</i>	Puffer O	Fermentas
	L506W	<i>Mlu1/BspT1</i>	Puffer O	Fermentas

Eingesetzt wurden je 5 µg DNA. Wurde mit den Enzymen *BsaA1* und *Mlu1* verdaut, so ist von beiden Enzymen je 1 µL zugegeben worden. In den Ansätzen, die mit *Mlu1* und *BspT1* geschnitten wurden, sind 2 µL *Mlu1* und 1 µL *BspT1* verwendet worden. Die Restriktionsansätze sind für 3 - 6 Stunden bei 37° C inkubiert worden.

Zur Herstellung der Kv2.1-Ionenkanalmutanten wurde zunächst die vierfache Mutation L291F/M295I/ I299L/ V395T eingefügt. Diese wurde dann zur weiteren Herstellung des sechsfach mutierten Kv2.1 ST+ZK-Ionenkanals verwendet.

Konstrukt	Mutationen	Restriktions- enzyme	Puffer	Firma
Kv2.1 ST	L291F, M295I, I299L und V395T	Nae1/Psy1	Fast Digest	Fermentas
Kv2.1 ST+ZK	L291F, M295I, I299L, C353A, V395T und I364V	Nae1/Psy1	Fast Digest	Fermentas

Für den Verdau wurden je 5 µg DNA eingesetzt. Es wurden von den Enzymen *NaeI* und *PstI* je 1,5 µL verwendet. Der Restriktionsverdau wurde für 45 min. bei 37°C inkubiert.

Es entstehen zwei DNA-Fragmente, die im nächsten Schritt mittels eines 1,5 %igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Anschließend konnte das gewünschte Fragment aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden.

2.1.16 Gelextraktion von DNA Fragmenten

Zur Extraktion des Inserts bzw. des Vektors aus dem Agarosegel wurde das peqGold Gel Extraction Kits der Firma Peqlab nach Herstellerangaben verwendet.

2.1.17 Ligation

Im Ligationsansatz soll ca. die 4 - 5fache Konzentration des Inserts bezogen auf den Vektor enthalten sein. Die jeweiligen Konzentrationen sind mit Hilfe der gelelektrophoretischen Auftrennung auf einem 1,5 %igen Agarosegel geschätzt und spektrometrisch gemessen worden. Außerdem sind die entsprechenden Mengen des 10fachen T4-Ligase Puffers und der T4-Ligase der Firma New England Biolabs zugegeben worden.

Für einen Reaktionsansatz von 10 µL sind die folgenden Volumina eingesetzt worden:

Insert	7,5 µL
Vektor	0,5 µL
T4-Ligase Puffer	1 µL
T4-Ligase	1µL

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16° C inkubiert.

2.1.18 Linearisierung von cDNA-Plasmiden

Zur Linearisierung wird ein Restriktionsenzym verwendet, dass das Plasmid an genau einer Stelle durchtrennt. Dazu wurde das linearisierende Restriktionsenzym mit dem zugehörigen Puffer und dem Plasmid gemischt und bei 37° C inkubiert. Die einzusetzende Menge des Enzyms und die Dauer der Inkubation sind von der Menge der eingesetzten DNA abhängig und werden vom Hersteller angegeben.

Die verwendeten Kv1.5- und Kv2.1-Ionenkanäle lagen im Vektor pSGEM vor. Zur Linearisierung wurde das Restriktionsenzym *Nhe1* und der zugehörige Tango-Puffer der Firma Fermentas verwendet. Zur Linearisierung von 5 µg DNA wurde 2 µL *Nhe1* verwendet. Die Inkubationsdauer betrug 1 Stunde.

2.1.19 *In-vitro* Transkription

Zur Synthese von cRNA sind folgende Volumina eingesetzt worden:

4,5 µL	linearisiertes Produkt
7,5 µL	2xNTP/Cap
1,5 µL	10x Reaktionspuffer
1,5 µL	Enzymmix des mMESSAGE mMACHINE®-Kits der Firma Ambion

Für die *in vitro* Transkription der Kv1.5- und Kv2.1-Ionenkanalmutanten im Vektor pSGEM wurde die T7-Polymerase zugegeben. Zur Transkription ist das Gemisch für 2 Stunden bei 37° C inkubiert worden. Im nächsten Schritt ist zum Abbau der DNA 0,5 µL *DNase* eingesetzt worden, und das Gemisch wurde für weitere 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Die anschließende gelektrophoretische Auftrennung diente der Überprüfung der Qualität der entstandenen cRNA.

2.1.20 Aufreinigung der cRNA: Präzipitation

Zur Aufreinigung der cRNA ist im Anschluss an die *in vitro* Transkription die Präzipitation durchzuführen. Folgende Volumina wurden eingesetzt:

15 µL	cRNA aus der <i>in-vitro</i> Transkription
25 µL	Lithiumchlorid
30 µL	<i>RNase</i> -freies Wasser

Das Gemisch wurde für 30 Minuten bei -20° C inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4° C zentrifugiert, so dass die cRNA pelletiert wurde. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das cRNA-Pellet mit 150 µL 80 %igen Ethanol gewaschen und daraufhin für 20 Minuten bei 13000 rpm und 4° C zentrifugiert. Von dem entstandenen Pellet wurde der Überstand abgenommen. Nach der vollständigen Abnahme des Ethanols wurde das Pellet bei 37° C getrocknet und anschließend in 15 µL *RNase*-freiem Wasser resuspendiert. Es erfolgte daraufhin die Überprüfung der Qualität der entstandenen präzipitierten cRNA mittels gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem 1,5 %igen Agarosegel.

2.2 Elektrophysiologie

2.2.1 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Zur Durchführung von Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (englisch: two-electrode voltage clamp, TEVC), werden zwei Elektroden in eine Zelle hinein gestochen. In den von mir durchgeführten Experimenten handelt es sich um *Xenopus laevis* Oozyten. Die eine Elektrode fungiert als Spannungselektrode, die andere als Stromelektrode. Außerdem ist eine Referenzelektrode notwendig, die in Kontakt mit der Badlösung ist, in dem die Oozyte von der Messlösung umgeben ist. Mit der Spannungselektrode kann die Potentialdifferenz zu Referenzelektrode bestimmt werden. Befindet sich die Spannungselektrode innerhalb einer Zelle, kann also die Spannung über der Membran ermittelt werden, wobei das Potential der Badlösung per Definition 0

mV ist. Die Potentialdifferenz wird als „Membranpotential“ bezeichnet. Die Stromelektrode muss ebenfalls Kontakt zum Intrazellulärraum haben. Sie injiziert Strom und kann so das Membranpotential beeinflussen. Mit Hilfe der zugehörigen Software wird ein Spannungsprotokoll erstellt. Hierzu werden das gewünschte Haltepotential sowie Veränderungen des Membranpotentials für bestimmte Zeiten festgelegt. Die Spannungselektrode misst gegen die Referenzelektrode das tatsächliche Membranpotential, die Stromelektrode passt dann das tatsächliche Membranpotential an das im Spannungsprotokoll vorgegebene an. Das Membranpotential wird somit geklemmt. Wenn eine Depolarisation ausgelöst wird und dadurch spannungsgesteuerte Ionenkanäle öffnen, so fließt ein Strom über die Zellmembran, wodurch sich das Membranpotential verändert. Dieses wird durch den Abgleich von Spannungselektrode zu Referenzelektrode detektiert und durch die Stromelektrode ausgeglichen. Das System misst den Strom, der zum Ausgleich notwendig ist. Da dieser dem Strom entspricht, der über die Zellmembran geflossen ist, kann indirekt der Strom durch die Ionenkanäle in der Membran gemessen werden.

2.2.2 *Xenopus laevis* Oozyten

Die elektrophysiologischen Experimente wurden im Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt.

2.2.3 Messlösung für TEVC-Messungen mit *Xenopus laevis* Oozyten

Als Messlösung in den TEVC-Experimenten ist ND96 [NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM] verwendet worden. Zur Einstellung des pH-Werts wurde HCl oder NaOH zugegeben. Der pH-Wert lag bei 7,5. Als Pipettenlösung ist eine 3 M KCl-Lösung benutzt worden.

2.2.4 Lösung zur Aufbewahrung der *Xenopus laevis* Oozyten

Der Messlösung ND96 ist zur Herstellung der Aufbewahrungslösung pro Liter 88 mg Theophyllin, 50 mg Gentamycin und 275 mg Natrium-Pyruvat zugesetzt

worden. Die Aufbewahrungslösung wurde im Kühlschrank bei 4° C gelagert. Das benötigte Gentamycin ist von der Firma Sigma Aldrich bezogen worden.

2.2.5 Injektionspipetten für die cRNA-Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten

Mittels des DMZ Universal Puller von der Zeitz-Instrumente GmbH sind die Injektionspipetten aus 3,5 Drummond Replacement Tubes der Firma Drummond Scientific Company hergestellt worden. Um den Durchmesser der Injektionspipetten gleichbleibend auf 10 µm einzustellen und um scharfe Kanten an der Spitze der Injektionspipetten zu vermeiden, sind die Injektionspipetten mit der Microforge MF-830 von Narishige nachbearbeitet worden.

2.2.6 cRNA-Injektion

Zur Injektion der cRNA in die *Xenopus laevis* Oozyten ist der Nanoject II Mikroinjektor der Drummond Scientific Company verwendet worden. Die *Xenopus laevis* Oozyten befanden sich während der Injektion in Aufbewahrungslösung. Pro Oozyte ist, abhängig von der Stromamplitude des injizierten Konstrukts, 10 bis 50 nL *in-vitro* synthetisierter cRNA injiziert worden.

2.2.7 TEVC-Spannungsprotokolle

Es wurden folgende Spannungsprotokolle für die TEVC-Messungen verwendet:

Protokoll „Pharmakologie Psora-4“: Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden Testpulse für 2 Sekunden zu +40 mV appliziert. Um eine vollständige Erholung von der Inaktivierung zu gewährleisten, wurden die Testpulse im Abstand von 10 Sekunden appliziert.

Protokoll „IV kurz“: Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden Testpulse zwischen -70 mV und +70 mV in 10 mV-Schritten für eine Dauer von 200 ms angelegt. Es folgte das Potential -40 mV für 290 ms.

Protokoll „Pharmakologie Arachidonsäure“: Das Haltepotential war -80 mV. Es wurden 2 Testpulse, der erste zu 0 mV, der zweite zu +40 mV mit einer Dauer

von je 2 Sekunden appliziert. Der Abstand zwischen den beiden Testpulsen lag bei 1 Sekunde. Das Protokoll wurde im Abstand von 10 Sekunden wiederholt.

Protokoll „IV lang“: Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden Testpulse zwischen -70 mV und +70 mV in 10 mV-Schritten für eine Dauer von 1 Sekunde angelegt. Es folgte das Potential -40 mV für 290 ms.

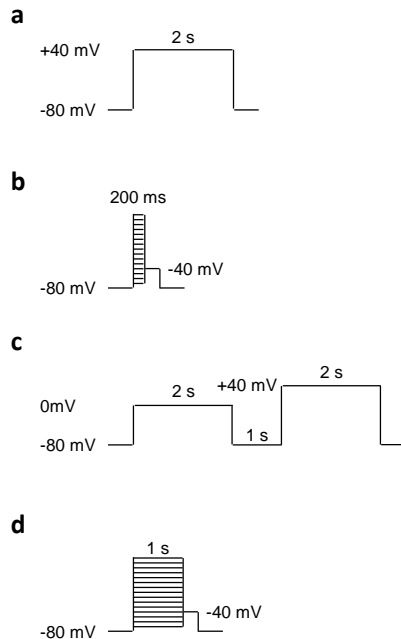


Abbildung 2.2.7-1: Die TEVC-Spannungsprotokolle

Gezeigt ist ein Schema der am häufigsten verwendeten TEVC-Spannungsprotokolle. (a) Protokoll „Pharmakologie Psora-4“, (b) Protokoll „IV kurz“, (c) Protokoll „Pharmakologie Arachidonsäure“, (d) Protokoll „IV lang“.

Skizzen der genannten Messprotokolle sind in **Abb. 2.2.7-1** gezeigt. Diese Messprotokolle waren die am häufigsten verwendeten Protokolle. Abweichende Spannungsprotokolle werden direkt im Abschnitt „Ergebnisse“ erklärt.

2.2.8 Pharmaka

Es wurden für alle verwendeten Pharmaka zunächst Stocklösungen mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: Psora-4 10 mM, Bupivacain 125 mM, Aa 20 mM. Hierzu wurde eine entsprechende Menge Psora-4, Bupivacain oder Aa in DMSO gelöst. Diese Stocklösung wurde bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Zur Durchführung der elektrophysiologischen Messungen ist die jeweilige Substanz in der Messlösung ND96 auf die gewünschte Konzentration verdünnt worden. Nach dem Herstellen der gewünschten Lösung ist diese direkt genutzt worden. Innerhalb dieser Zeit wurde sie bei Raumtemperatur gelagert. Die Arachidonsäure-Lösung wurde zusätzlich lichtgeschützt gelagert.

2.2.9 Messelektroden für die TEVC-Messungen

Zur Herstellung der Messelektroden sind die Borosilikat-Kapillaren „GB 150TF-8P“ der Firma Science Products verwendet worden. Diese wurden mit dem DMZ Universal Puller der Zeitz-Instrumente GmbH in die für die Messung benötigte Form gebracht, so dass der Messwiderstand der Pipetten 0,5-1,6 M Ω betrug.

2.2.10 TEVC Messstände

Die elektrophysiologischen Messungen sind an zwei TEVC-Messständen durchgeführt worden. Messplatz 1 ist mit den Geräten „TurboTEC-10CD“ Verstärker (npi) und „Digidata 1200 Series“ als Analog/Digital-Wandler (Axon Instruments) ausgestattet. Messplatz 2 weist die Geräte „Axoclamp 900A“ Verstärker (Axon Instruments) und Analog/Digital-Wandler „Digidata 1440A“ (Axon Instruments) auf.

Sämtliche Messungen sind bei Raumtemperatur durchgeführt worden.

2.2.11 Datenanalyse

Zur Durchführung der TEVC-Messungen ist an beiden TEVC-Messständen das Programm „Clampex 10.0“ (Molecular Devices) verwendet worden. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm „Clampfit 10.0“ und später „Clampfit 10.3.1.4. (Molecular Devices). Die statistische Auswertung und Analyse der Ergebnisse ist mit dem Programm „Office Excel 2003“ und „Office Excel 2010“ (Microsoft) durchgeführt worden. Die wissenschaftlichen Abbildungen sind mit Programm OriginPro 7 und Origin 8.5.1 der Firma OriginLab Cooperation erstellt worden. Zur Gestaltung der Abbildungen der Struktur des Ionenkanals wurde das Programm PyMol (basierend auf der Version PyMol v0,99) von DeLano Scientific LLC und „Microsoft Power Point 2010“ (Microsoft) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Ein Hinweis auf eine Bindungsstelle außerhalb der zentralen Ionenkanalpore

Bupivacain und auch Kv β 1.3-Moleküle interagieren mit der Aminosäure L510, die auf der der Pore abgewandten Seite des S6-Segments im Kv1.5-Ionenkanal liegt (Decher et al, 2005; Franqueza et al, 1997; Marzian, 2009). An der Studie, die zeigt, dass Kv β 1.3 die Stereoselektivität der Inhibition des Kv1.5-Ionenkanals durch Bupivacain vermindert, war ich als Koautorin beteiligt (Arias et al, 2007). Diese Studie wird im Folgenden in Auszügen dargestellt. Die Ergebnisse wiesen auf eine mögliche Konkurrenz von Bupivacain und Kv β 1.3 um eine gemeinsame Bindungsstelle hin, die sich außerhalb der zentralen Pore des Ionenkanals befindet.

3.1.1 Die Inhibition des Kv1.5-Ionenkanals durch Bupivacain

Zur Durchführung der Experimente mittels der TEVC-Technik wurden die jeweiligen Ionenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten funktionell exprimiert. Die folgenden TEVC-Experimente wurden mit dem Protokoll „Pharmakologie Psora-4“ durchgeführt, das Testpulse zu +40 mV für eine Dauer von 2 s ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV generiert. Der Kv1.5-Ionenkanal aktivierte durch die Depolarisation. Während des Testpulses war die langsame C-Typ-Inaktivierung zu beobachten. Wurde das Haltepotential angelegt, so war der Kv1.5-Ionenkanal geschlossen und es floss kein Strom. Die Applikation von 250 μ M des Lokalanästhetikums Bupivacain führte zur Inhibition des während der Depolarisation generierten Stroms um ca. 80 % (**Abb. 3.1.1-1**). Die Auswertung erfolgte am Ende des Testpulses.

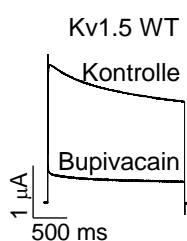


Abbildung 3.1.1-1: Die Inhibition des Kv1.5-Ionenkanals durch Bupivacain

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel einer TEVC-Messung des Kv1.5-Ionenkanals vor und nach der Applikation von 250 μ M Bupivacain.

3.1.2 Kv β 1.3 und Bupivacain konkurrieren um eine gemeinsame Bindungsstelle im Kv1.5-Ionenkanal

Kv1.5-Ionenkanäle werden durch Bupivacain stereoselektiv inhibiert. Wurden die Kv1.5-Ionenkanäle mit Kv β 1.3-Untereinheiten ko-exprimiert und dann entweder R- oder S-Bupivacain appliziert, so blockierten beide Enantiomere die Ionenkanäle in gleichem Maße. Die gleichzeitige Expression von Kv β 1.3-Untereinheiten hob den stereoselektiven Block Bupivacains auf (**Abb. 3.1.2-1**, links). Eine mögliche Konkurrenz um eine gemeinsame Bindungsstelle von Bupivacain und Kv β 1.3-Untereinheiten wurde untersucht, in dem das beschriebene Experiment mit den Kv1.5-Ionenkanalmutanten L510A und V514A wiederholt wurde. Für beide Ionenkanalmutanten konnte ein stereoselektiver Bupivacain-Block gezeigt werden (**Abb. 3.1.2-1**, Mitte und rechts). Wurden Kv β 1.3-Untereinheiten mit L510A ko-exprimiert und Bupivacain appliziert, so konnte die Stereoselektivität Bupivacains nicht aufgehoben werden (**Abb. 3.1.2-1**, Mitte). Im Gegensatz dazu hob die Ko-Expression von Kv β 1.3-Untereinheiten mit V514A die Stereoselektivität, wie auch im Kontrollexperiment mit dem Kv1.5-WT-Ionenkanal, auf (**Abb. 3.1.2-1**, rechts). Diese Ergebnisse wiesen auf L510 als eine überlappende Bindungsstelle für Bupivacain und Kv β 1.3-Untereinheiten hin (Arias et al, 2007).

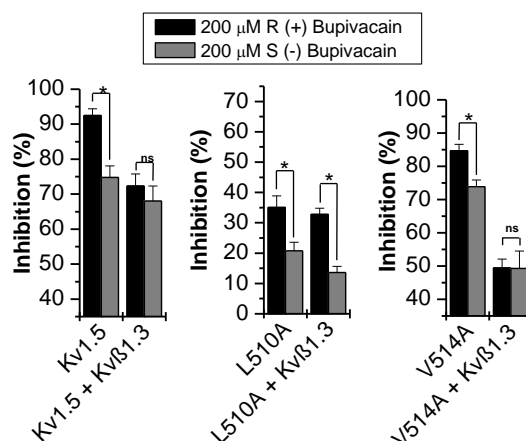


Abbildung 3.1.2-1: Effekt von Kv β 1.3 auf die Stereoselektivität der Inhibition durch Bupivacain

Inhibition durch R- bzw. S-Bupivacain von Kv1.5-WT- (links) L510A- (Mitte) und V514A-Ionenkanälen (rechts) je mit und ohne Ko-Expression mit Kv β 1.3-Untereinheiten (n = 4-6). Die Werte sind als Mittelwerte und SEM dargestellt (p<0,05: *), ns = nicht signifikant.

3.1.3 Die Position der Aminosäure L510 gibt einen Hinweis auf eine weitere Bindungsstelle im Kv1.5-Ionenkanal

Die Aminosäure L510 befindet sich im porenbildenden S6-Segment des Kv1.5-Ionenkanals. Die klassische Medikamenten-Bindungsstelle liegt innerhalb der zentralen Pore. Der Rest von L510 ist jedoch nicht in die zentrale Pore hinein gerichtet. Er befindet sich auf der der Pore abgewandten Seite des S6-Segments und zeigt in eine Seitentasche hinein, die von dem S5-Segment der gleichen Untereinheit, sowie von dem S4-S5-Linker und dem unteren Bereich des S4-Segments der benachbarten Untereinheit gebildet wird. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich somit ein Hinweis darauf, dass Pharmaka auch außerhalb der zentralen Ionenkanalpore an eine Bindungsstelle binden könnten.

3.2 Die Bindungsstellen und der Inhibitionsmechanismus von Psora-4

Obwohl die zentrale Pore der Kv-Kanäle hochkonserviert ist, unterscheidet der Blocker Psora-4 zwischen den Kv-Kanälen und inhibiert selektiv Kv1-Kanäle. Der Inhibitionsmechanismus, der diesem ungewöhnlichen Block zugrunde liegt, ist von großem Interesse und wurde in der folgenden Studie untersucht (Marzian et al, 2013). Er könnte Aufschluss über das molekulare Korrelat zu einer Kv1-spezifischen Inhibition geben und somit die Entwicklung spezifischer Inhibitoren ermöglichen.

3.2.1 Charakterisierung der Psora-4-Affinität und Kv1-Spezifität

Die zentrale Pore der Kv-Kanäle ist hochkonserviert (**Abb. 3.2.1-1a**). Dennoch wurde gezeigt, dass Psora-4 spezifisch Kv1.3- und Kv1.5-Ionenkanäle blockiert, während andere, homologe Kv-Kanäle, wie z.B. der Kv3.1-Ionenkanal, nur durch deutlich höhere Konzentrationen im millimolaren Bereich inhibiert werden können (Vennekamp et al, 2004). In dieser Studie wurde das heterologe Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten und TEVC-Experimente genutzt. Es wurde das Spannungsprotokoll „Pharmakologie Psora-4“ (s. Material und

Methoden, Punkt 2.2.7) angelegt. Die Testpulse wurden in einem Intervall von 10 Sekunden wiederholt, so dass eine Erholung der Ionenkanäle von der Inaktivierung gewährleistet war. Eine Akkumulation der Inaktivierung hätte dazu geführt, dass der durch Psora-4 induzierte Block als zu hoch eingeschätzt würde. Zur Auswertung der durch die Applikation von Psora-4 erfolgten Inhibition des Stroms sind die Stromamplituden vor und nach der Psora-4 Applikation und anschließender Stabilisierung verglichen worden. Der Block in Prozent wurde am Ende des Testpulses ausgewertet. Das Überprüfen der oben genannten Ergebnisse zeigte, dass 500 nM Psora-4 selektiv Kv1.1-, Kv1.2, Kv1.5- und Kv1.6-Ionenkanäle blockiert, während die homologen Kv2.1-, Kv3.1- und Kv4.3-Ionenkanäle nur geringfügig inhibiert werden (**Abb. 3.2.1-1b**). Es wurde vermutet, dass Psora-4 vor allem den inaktivierten Zustand des Ionenkanals blockiert (Vennekamp et al, 2004). In dieser Studie wurde der einwärts-gleichrichtende („delayed rectifier“) Kv1.5-Ionenkanal verwendet, der ein geringes Maß an C-Typ-Inaktivierung aufweist, um Auswirkungen der Inaktivierung auf die Interaktion mit Psora-4 möglichst gering zu halten.

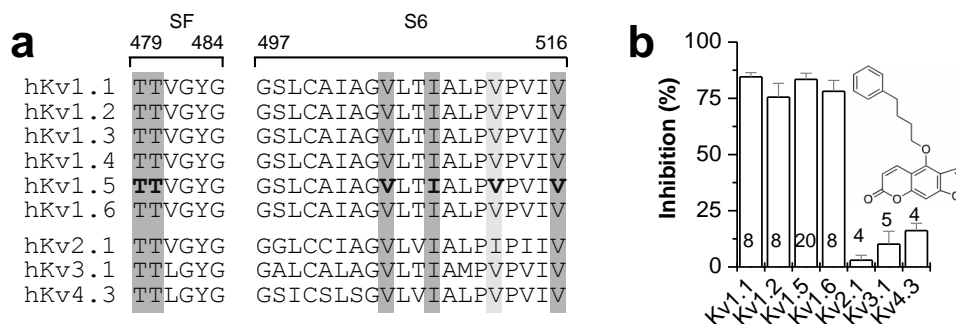


Abbildung 3.2.1-1: Konservierung der zentralen Pore der Kv-Kanäle

(a) Sequenzvergleich des Selektivitätsfilters (SF) und des porenbildenden S6-Segments von Kv-Kanälen. Die klassische Medikamentenbindungsstelle ist grau hinterlegt. (b) Inhibition verschiedener Kv-Kanäle durch 500 nM Psora-4. Das Einsatzbild zeigt die Struktur von Psora-4. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Wiederholungen der Experimente (n) an.

Die Konzentrations-Wirkungskurve von Psora-4 auf Kv1.5-Ionenkanäle wurde ermittelt. Dazu wurde Psora-4 in den Konzentrationen 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM und 500 nM appliziert. Abbildung 3.2.1-2 zeigt die ermittelte durchschnittliche Inhibition durch die jeweils zugegebenen Psora-4-

Konzentrationen. Da die Konzentrations-Wirkungskurve sigmoidal verläuft, wurden die Psora-4-Konzentrationen so gewählt, dass sie im ansteigenden Abschnitt des Graphen liegen, da so der Kurvenverlauf möglichst genau ermittelt werden kann. Der Kurvenverlauf wurde mit dann mit der Hill-Funktion beschrieben. Der Hill-Koeffizient ist ein Maß für die Steigung des Graphen. Die Psora-4-Konzentration, die zu einer 50 %igen Inhibition des Stroms führt, wird als „IC₅₀-Wert“ bezeichnet und kann mittels der Hill-Funktion ermittelt werden. Der IC₅₀-Wert für Psora-4 im Kv1.5-Ionenkanal betrug ca. 190 nM mit einem Hill-Koeffizienten von $2,81 \pm 0,61$. Der hohe Hill-Koeffizient (>1) wies auf eine hohe Kooperativität hin. Dies bedeutet, dass Psora-4-Moleküle an mehr als einer Bindungsstelle im Ionenkanal binden könnten und die Bindung an eine Bindungsstelle die Bindung an weitere Bindungsstellen vereinfacht. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass mehrere Psora-4-Moleküle gleichzeitig mit dem Ionenkanal interagieren könnten.

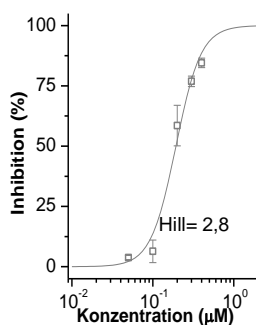


Abbildung 3.2.1-2: Die Konzentrations-Wirkungskurve von Psora-4

Die Konzentrations-Wirkungskurve von Psora-4 auf Kv1.5-Ionenkanäle. In der Abbildung sind die Werte als Mittelwert und SEM gezeigt.

Auch für andere Kv-Ionenkanäle wurden Konzentrations-Wirkungskurven mit 3-5 verschiedenen Psora-4-Konzentrationen und 3-7 Messungen pro Konzentration erstellt. Der IC₅₀ lag für Kv1.1-Ionenkanäle bei 220 ± 12 nM, für Kv1.2-Ionenkanäle bei 226 ± 14 nM, und für Kv1.6-Ionenkanäle bei 182 ± 5 nM und damit im gleichen Bereich wie für den Kv1.5-Ionenkanal. Hingegen lag der IC₅₀ für Kv2.1-Ionenkanäle bei ca. 3900 nM, für Kv3.1-Ionenkanäle bei ca. 6420 nM und für Kv4.3-Ionenkanäle bei ca. 3990 nM. Diese hohen Werte mussten abgeschätzt werden, da Psora-4 sehr lipophil und damit in der Messlösung nur eingeschränkt löslich war. Diese Ergebnisse unterstreichen die bereits angesprochene Kv1-Spezifität von Psora-4.

Um zu überprüfen, in welchem Zustand die Kv1.5-Ionenkanäle inhibiert werden, wurden „first pulse“-Experimente (zu Deutsch: erster-Puls Experimente) durchgeführt. Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigte, dass 500 nM Psora-4

den Strom der Kv1.5-Ionenkanäle zu ca. 75% inhibieren, wenn das Protokoll „Pharmakologie Psora-4“ verwendet wird, das alle 10 s Testpulse zu +40 mV generiert (**Abb. 3.2.1-2**). Für die „first-pulse“-Experimente wurden nach einem Testpuls zu +40 mV 500 nM Psora-4 für 12 Minuten appliziert, ohne dass weitere Pulse erfolgten. Es erfolgte also keine Depolarisation, so dass die Ionenkanäle während dieser 12 Minuten im geschlossenen Zustand vorlagen. Anschließend wurden bei anhaltender Psora-4-Applikation Testpulse durch das Verwenden des Spannungsprotokolls „Pharmakologie Psora-4“ generiert (**Abb. 3.2.1-3**). Der erste Puls nach der 12-minütigen pulsfreien Zeit zeigte keine Inhibition durch Psora-4. Folglich konnte Psora-4 Kv1.5-Ionenkanäle im geschlossenen Zustand nicht inhibieren. Die nachfolgenden Pulse führten schrittweise zu einer stärkeren Inhibition. Zu einer Inhibition durch Psora-4 kam es also durch repetitives Öffnen und Schließen des Ionenkanals (**Abb. 3.2.1-3**).

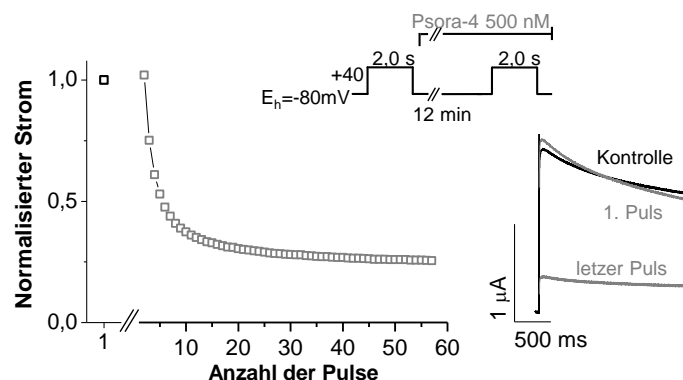


Abbildung 3.2.1-3: Die „first-pulse“-Experimente

Kv1.5-Ionenkanäle unter Kontrollbedingungen und nach einer 12-minütigen pulsfreien Zeit bei Applikation von 500 nM Psora-4. Das obere Einsatzbild zeigt das Spannungsprotokoll, das rechte Einsatzbild eine repräsentative Messung.

3.2.2 Alanin-Scan der zentralen Ionenkanalpore

Im Kv1.5-Ionenkanal wurden die Aminosäuren G497-V516 im porenbildenden S6-Segment und T479-T480 in der Porenschleife, nahe am Selektivitätsfilter, mittels zielgerichteter Mutagenese einzeln durch Alanine ersetzt. Alanine wurden durch Valine ersetzt. Die Affinität von Psora-4 sollte durch eine Mutation einer Aminosäure, die an der Interaktion mit Psora-4 beteiligt ist, deutlich

reduziert werden. Somit sollte Psora-4 diese mutierten Ionenkanäle in geringerem Maße inhibieren. Es wurde das Spannungsprotokoll „Pharmakologie Psora-4“ verwendet. Anhand der oben beschriebenen Konzentrations-Wirkungskurve wurde bestimmt, welche Psora-4-Konzentration zu einer ca. 75 %igen Inhibition der Kv1.5-Ionenkanäle führt. Eine Konzentration, die am Beginn des Sättigungsbereiches der Konzentrations-Wirkungskurve des Wildtyps (WT) liegt, eignet sich als Scan-Konzentration für den Alanin-Scan aller Ionenkanalmutanten, da eine Verringerung der Inhibition sehr gut untersucht werden kann. Als Alanin-Scan-Konzentration wurde 500 nM ausgewählt.

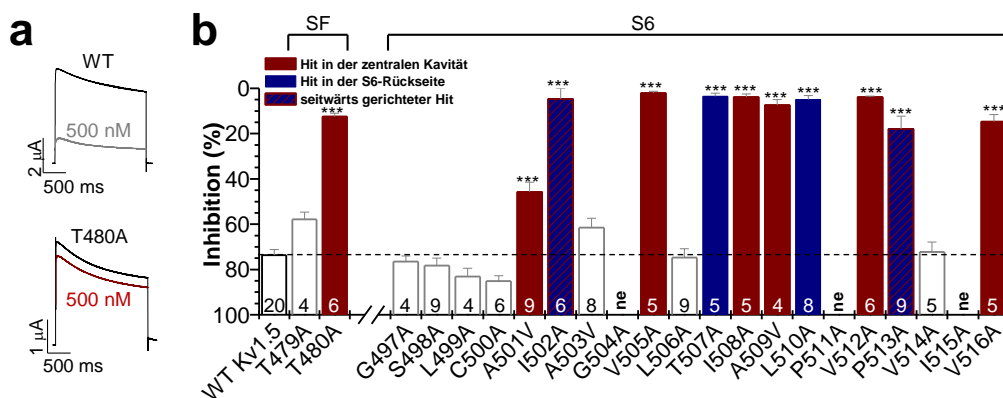


Abbildung 3.2.2-1: Alanin-Scan des S6-Segments mit 500 nM Psora-4

(a) Beispielmessungen des Alanin-Scans des S6-Segments vor und nach Psora-4-Applikation. (b) Alanin-Scan des S6-Segments mit 500 nM Psora-4 (n= Zahlen in den Balken). Die gestrichelte Linie zeigt die Inhibition des Kv1.5-WTs an, SF = Selektivitätsfilter. Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt ($p < 0,001$: ***).

Der durch Kv1.5-Ionenkanäle generierte Strom wurde durch Applikation von 500 nM um ca. 75 % verringert (**Abb. 3.2.2-1a und b**). 11 der 19 funktionell exprimierenden mutierten Ionenkanäle zeigten eine signifikant ($p > 0,001$) verringerte Inhibition durch Psora-4 (**Abb. 3.2.2-1a und b**). Einige dieser mutierten Ionenkanäle wiesen Mutationen von Aminosäuren auf, die zur typischen Medikamenten-Bindungsstelle in der zentralen Ionenkanalpore gehören: T480 (Porenschleife) und V505, I508, V512 und V516 im S6-Segment. Zwei weitere Aminosäuren, deren Reste in die Pore gerichtet sind, zeigten ebenfalls eine verringerte Inhibition: A501 und A509. Frühere Studien

belegen, dass diese Mutationen auch die Bindung von anderen Inhibitoren und Kv β 1.3 an die zentrale Ionenkanalpore behindern (Decher et al, 2008; Decher et al, 2005). Weiterhin sind einige der identifizierten Aminosäuren (Hits) nicht in die zentrale Ionenkanalpore gerichtet, sondern zeigen in die entgegengesetzte Richtung oder sind seitlich der Pore lokalisiert: I502, T507, L510, P513 (**Abb. 3.2.2-1b und 3.2.2-3a und b**).

Als Maß für die Potenz einer Substanz wird der IC₅₀-Wert verwendet. Um eine Aussage über die Verringerung der Potenz für die Ionenkanalmutanten gegenüber dem WT zu treffen, wird der Faktor bestimmt, um den der IC₅₀-Wert der Mutante von dem des WT abweicht. Die Untersuchung der IC₅₀-Werte ergab eine Erhöhung des IC₅₀-Werts für elf der mutierten Ionenkanäle (**Abb. 3.2.2-2c**), mit den deutlichsten Erhöhungen für T480A (74-fach), V505A (195-fach), T507A (82-fach), I508A (63-fach), A509V (82-fach) und P513 (53-fach). Da Psora-4 eine lipophile Substanz und daher in der Messlösung nur eingeschränkt löslich ist, sind die Messungen mit einer maximalen Psora-4-Konzentration von 3 μ M durchgeführt worden, so dass die IC₅₀-Werte für Ionenkanalmutanten, für die eine stark verringerte Psora-4-Potenz festgestellt wurde, abgeschätzt werden mussten.

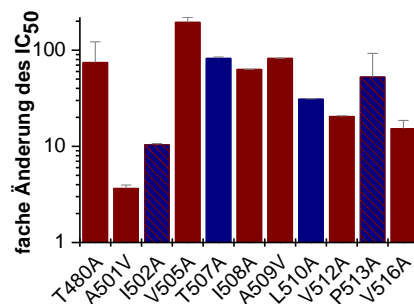


Abbildung 3.2.2-2: Veränderung des IC₅₀-Werts für Ionenkanalmutanten des S6-Segments

Veränderungen des IC₅₀-Werts von Psora-4 für die im Alanin-Scan identifizierten Ionenkanalmutanten. Die Ionenkanalmutanten sind farblich gekennzeichnet (rot: Der Aminosäurerest ist in die zentrale Pore, blau: aus der Pore heraus gerichtet). Die IC₅₀-Werte wurden mittels 2-5 Psora-4-Konzentrationen mit denen jeweils 3-9 Messungen durchgeführt wurden, bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt.

Basierend auf der Kristallstruktur des rKv1.2-Ionenkanals kann auf die Position der Psora-4-Bindungsstelle im S6-Segment geschlossen werden. **Abb. 3.2.2-3a** zeigt die S6-Segmente und Porenschleifen zweier einander gegenüberliegender Untereinheiten. Die im Scan identifizierten Aminosäuren sind hervorgehoben. Es wird deutlich, dass sowohl Reste der Aminosäuren, die die zentrale Ionenkanalpore auskleiden, als auch solche auf der der Pore abgewandten „Rückseite“ des S6-Segments für die Interaktion mit Psora-4 von Bedeutung sind. Auffallend ist die räumliche Nähe dieser Aminosäurereste zum S5-Segment des Ionenkanals (**Abb. 3.2.2-3b**). Aus diesem Grund wurde ein S5-Scan im Kv1.5-Ionenkanal durchgeführt.

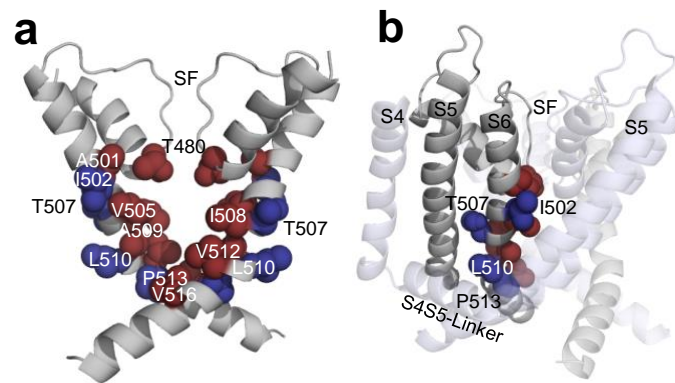


Abbildung 3.2.2-3: Position der im Alanin-Scan identifizierten Aminosäurereste

Dargestellt sind (a) die Porenschleifen und S6-Segmente zweier einander gegenüberliegender Untereinheiten des Kv1.5-Ionenkanals und (b) S4- bis S6-Segment bzw. S5- bis S6-Segment zweier benachbarter Untereinheiten des Kv1.5-Ionenkanals, von der der Pore abgewandten Seite betrachtet (SF=Selektivitätsfilter). Die identifizierten Aminosäurereste sind farblich hervorgehoben (rot: in die zentrale Pore gerichtet, blau: aus der zentralen Pore heraus gerichtet).

3.2.3 Alanin-Scan des S5-Segments

Untersucht wurden die Kv1.5-Ionenkanalmutanten E433A-S449A. Die meisten mutierten Ionenkanäle, wie z.B. G444A, wurden in ähnlichem Maße wie der Kv1.5-WT blockiert, während einige, wie z.B. F440A, Psora-4 resistent waren (**Abb. 3.2.3-1a und b**). **Abb. 3.2.3-1b** zeigt die Inhibition der

Ionenkanalmutanten des S5-Segments durch 500 nM Psora-4. Für die Ionenkanalmutanten L437A, F439A, F440A, I443A, L447A und F448A wurde eine signifikante ($p < 0,001$) Verringerung der Potenz von Psora-4 festgestellt. In der Abbildung **Abb. 3.2.3-1c** ist die Veränderung des IC_{50} -Wertes der identifizierten Kv1.5-Mutanten, bezogen auf den IC_{50} -Wert des WT, dargestellt. Die größten Veränderungen sind für I443A (276-fach), F440A (57-fach) und F439A (24-fach) festgestellt worden.

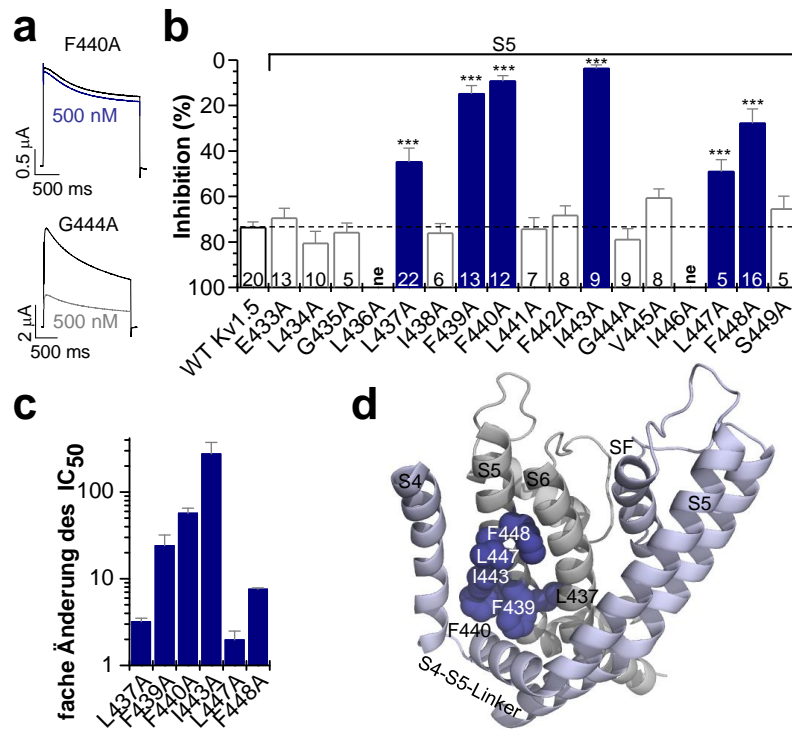


Abbildung 3.2.3-1: Alanin-Scan des S5-Segments mit 500 nM Psora-4

(a) Beispielmessungen des Alanin-Scans des S5-Segments vor und nach Psora-4-Applikation. (b) Alanin-Scan des S5-Segments mit 500 nM Psora-4 (n = Zahlen in den Balken). Die gestrichelte Linie zeigt die Inhibition des Kv1.5-WTs an. (c) Änderungen des IC_{50} -Werts für Ionenkanalmutanten des S5-Segments. Es wurden 2-3 Psora-4-Konzentrationen mit je 3-22 Einzelmessungen durchgeführt. (d) S4- bis S6-Segment bzw. S5- bis S6-Segment zweier benachbarter Untereinheiten des Kv1.5-Ionenkanals, von der der Pore abgewandten Seite betrachtet. Die im S5-Scan identifizierten Aminosäurereste sind hervorgehoben (SF=Selektivitätsfilter). In der gesamten Abbildung sind die Werte als Mittelwert und SEM gezeigt ($p < 0,001$: ***).

In **Abb. 3.2.3-1d** ist die Lokalisation der identifizierten Aminosäuren dargestellt. Die Abbildung zeigt Teile zweier benachbarter Untereinheiten. Die Reste der im Alanin-Scan identifizierten Aminosäuren des S5-Segments befinden sich auf der der Pore abgewandten Seite des S5-Segments. Sie alle liegen ungefähr auf der gleichen Seite der Helix. Außerdem sind sie den Aminosäuren T507 und L510 des S6-Segments sehr nahe, die im S6-Scan identifiziert wurden, aber deren Reste nicht in die zentrale Ionenkanalpore gerichtet und nicht Bestandteil der klassischen Medikamenten-Bindungsstelle sind. Es scheint unmöglich, dass ein Psora-4-Molekül gleichzeitig mit den Resten der Aminosäuren der klassischen Medikamenten-Bindungsstelle in der zentralen Ionenkanalpore und mit denen der Aminosäuren auf der der Pore abgewandten Seite interagiert. Neben der räumlichen Nähe der „Rückseiten“ der S5- und S6-Segmente der gleichen Untereinheit wird deutlich, dass der S4-S5-Linker und der untere Teil des S4 Segments der benachbarten Untereinheit sich in der Nähe befinden. Diese Domänen bilden eine hydrophobe Seitentasche, die eine weitere, nicht hochkonservierte Medikamenten-Bindungsstelle im Ionenkanal sein könnte.

3.2.4 Alanin-Scan des S4-S5-Linkers und des S4-Segments

Wenn Psora-4 mit den hydrophoben Seitentaschen interagiert, sollten auch Aminosäuren des S4-Segments und des S4-S5-Linkers beteiligt sein. Es wurde daher ein Alanin-Scan des unteren S4-Segments R409-R418 und des S4-S5-Linkers G419-Q428 durchgeführt. In Abbildung **Abb. 3.2.4-1a** sind repräsentative Messungen gezeigt, die Abbildungen **Abb. 3.2.4-1 b und c** zeigen die Ergebnisse des Alanin-Scans dieser Bereiche. Der Großteil der mutierten Ionenkanäle zeigte eine WT-ähnliche Psora-4-Affinität, für acht Mutanten war jedoch die Psora-4-Affinität signifikant ($p > 0,001$) verringert: Im S4-Segment sind die Aminosäuren I410, K412, L413 und H416, im S4-S5-Linker L420, L423, G424 und L427 für die Interaktion mit Psora-4 von entscheidender Bedeutung. Die Veränderungen des IC_{50} -Wertes für diese Mutanten sind in **Abb. 3.2.4-1d** gezeigt. Die Reste der identifizierten Aminosäuren sind ungefähr auf der gleichen Seite der Helix lokalisiert und in die hydrophobe Seitentasche gerichtet (**Abb. 3.2.4-1e**). Psora-4 bindet an diese

hydrophobe Seitentasche und bewirkt eine spezifische Inhibition der Kv1-Kanäle.

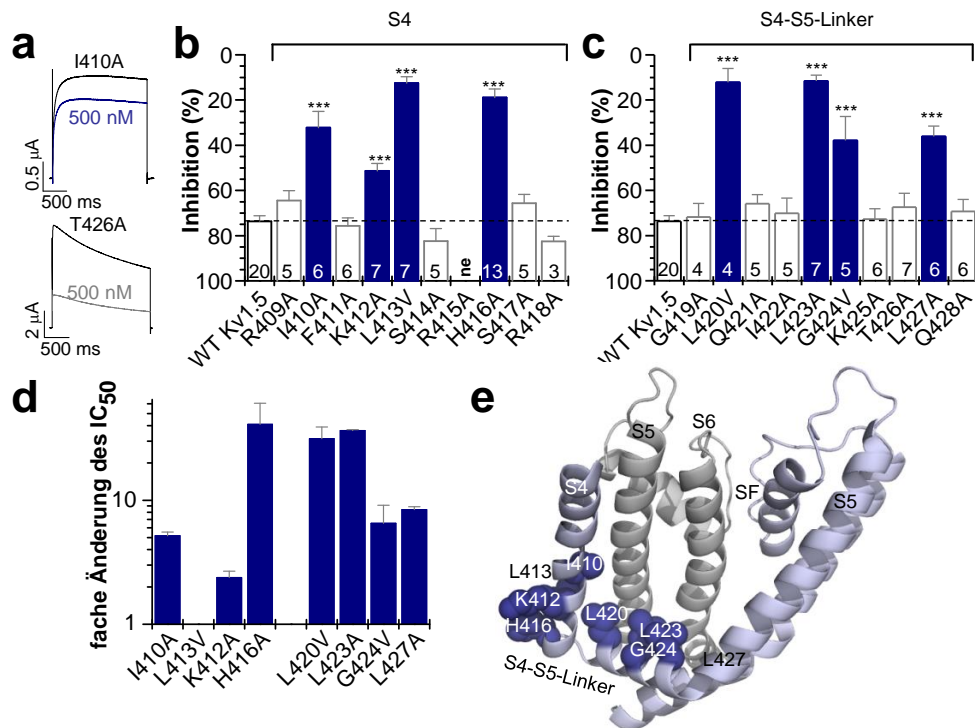


Abbildung 3.2.4-1: Alanin-Scan des S4-Segments und des S4-S5-Linkers mit 500 nM Psora-4

(a) Repräsentative Messungen des Alanin-Scans des S4-Segments und des S4-S5-Linkers vor und nach Psora-4-Applikation. (b) Alanin-Scan des S4-Segments mit 500 nM Psora-4. (c) Alanin-Scan des S4-S5-Linkers mit 500 nM Psora-4. (b-c) Die gestrichelte Linie gibt die Inhibition des Kv1.5-WTs an. (d) Veränderungen des IC_{50} -Werts für Ionenkanalmutanten des S4-Segments und des S4-S5-Linkers. Es wurden 2-4 Psora-4-Konzentrationen mit je 3-13 Einzelmessungen verwendet. (e) S4- bis S6-Segment bzw. S5- bis S6-Segment zweier benachbarter Untereinheiten des Kv1.5-Ionenkanals. Die Reste der identifizierten Aminosäuren im S4-Segment und S4-S5-Linker sind hervorgehoben. In der gesamten Abbildung sind die Werte als Mittelwert und SEM gezeigt ($p < 0,001$: ***). n= Zahlen in den Balken, SF=Selektivitätsfilter.

3.2.5 Kontrollmessungen

Die durch die Scans identifizierten Aminosäuren gehören zur Psora-4-Bindungsstelle. Es wäre allerdings auch möglich, dass indirekte Effekte der

beobachteten verringerten Potenz von Psora-4 für einige der Ionenkanalmutanten zu Grunde liegen.

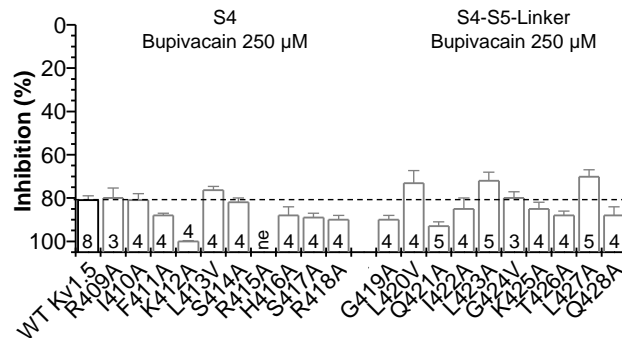


Abbildung 3.2.5-1: Kontrollexperiment: Alanin-Scan mit Bupivacain

Alanin-Scan des S4-Segments und des S4-S5-Linkers mit 250 µM Bupivacain (n= Zahlen in den Balken). Die gestrichelte Linie gibt die Inhibition des Kv1.5-WTs an. Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt.

So könnte ein allosterischer Effekt, ausgelöst durch die eingefügte Mutation, eine Bindung von Psora-4 an die Bindungsstelle verhindern, ohne dass die ausgetauschte Aminosäure selbst zur Bindungsstelle gehört. Als Kontrollexperiment diente hier der Alanin-Scan des S4-S5-Linkers und des S4-Segments mit dem unspezifischen Kv-Kanal-Inhibitor Bupivacain, der während meiner Diplomarbeit durchgeführt wurde, um sicherzugehen, dass der Ionenkanal trotz der eingefügten Mutation blockiert werden kann. Alle Ionenkanalmutanten waren durch Bupivacain blockierbar (Marzian, 2009). Somit sind die beobachteten Psora-4 Effekte spezifisch und die identifizierten Aminosäuren bilden Medikamenten-Bindungsstellen. Die in der Diplomarbeit bereits erzielten Ergebnisse sind hier nochmal in **Abb. 3.2.5-1** gezeigt, um die Kontrollexperimente vollständig darzustellen.

Es wurde beschrieben, dass Psora-4 bevorzugt an den inaktivierten Ionenkanal bindet (Vennekamp et al, 2004). Da das Einfügen von Mutationen den Grad der C-Typ-Inaktivierung beeinflusst, wurde die gemessene Inhibition gegen die Inaktivierung aufgetragen. Es besteht kein Zusammenhang zwischen der erzielten Inhibition und der vorliegenden Inaktivierung (**Abb. 3.2.5-2a-d**).

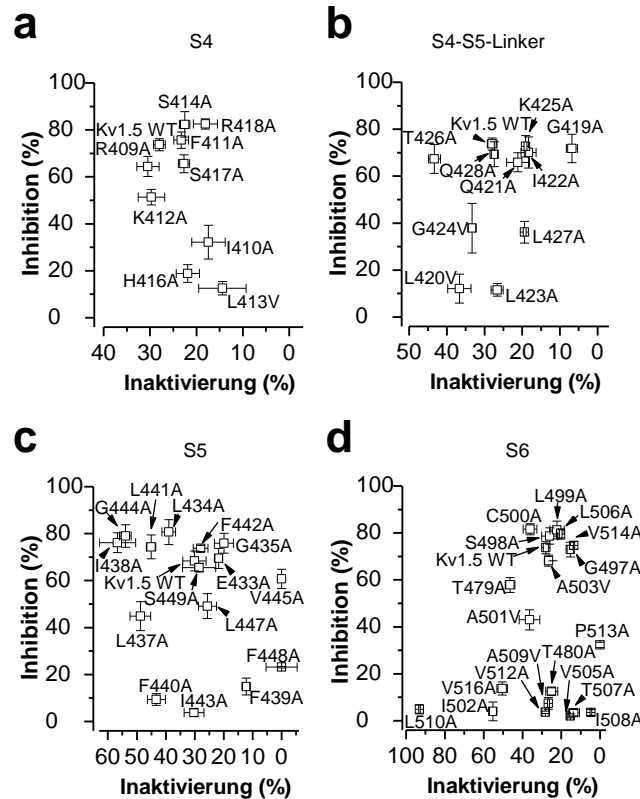


Abbildung 3.2.5-2: Kontrollexperiment: Keine Korrelation zwischen der Inhibition und der Inaktivierung der Ionenkanalmutanten

Die Inhibition der Ionenkanalmutanten (a) des S4-Segments ($n = 4-15$), (b) des S4-S5-Linkers ($n = 3-15$), (c) des S5-Segments ($n = 4-15$) und (d) des S6-Segments ($n = 3-15$) aufgetragen gegen die Inaktivierung der Ionenkanalmutanten unter Kontrollbedingungen. In der Abbildung sind die Werte als Mittelwert und SEM gezeigt.

Das S4-Segment ist der Hauptspannungssensor des Ionenkanals. Mutationen in diesem Bereich ändern möglicherweise die Spannungsabhängigkeit des Ionenkanals. Um auszuschließen, dass die beobachtete Reduzierung der Psora-4-Potenz lediglich auf eine Verschiebung des Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Spannung über der Membran einiger Ionenkanalmutanten zurückzuführen ist, wurde die Spannung über der Membran ermittelt, bei der 50 % der Ionenkanäle geöffnet sind. Dieser Wert wird als $V_{1/2}$ -Wert bezeichnet. Um diesen Wert zu bestimmen, wurde das Spannungsprotokoll „IV kurz“ angelegt. Ausgewertet wurde die Stromamplitude direkt nach dem Spannungssprung zu -40 mV. Durch das Auftragen dieser Stromamplitude gegen das vorher angelegte Potential zwischen -70 mV und +70 mV konnte die Leitfähigkeit des

Ionenkanals für jedes Potential unabhängig von der elektrischen Triebkraft ermittelt werden.

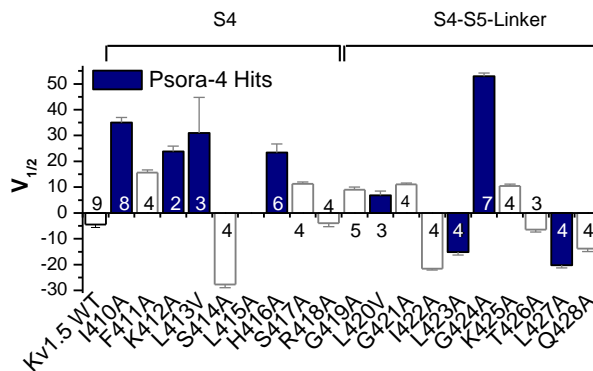


Abbildung 3.2.5-3: Kontroll-experiment: Die $V_{1/2}$ -Werte der Ionenkanalmutanten des S4-Segments und des S4-S5-Linkers

Die im Alanin-Scan mit Psora-4 identifizierten Hits sind blau hervorgehoben. (n = Zahlen in den Balken). Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt.

Die Ionenkanalmutanten wiesen veränderte $V_{1/2}$ -Werte auf (**Abb. 3.2.5-3**). Jedoch wiesen Ionenkanäle mit deutlich verringerter Psora-4-Potenz sowohl positive als auch negative Veränderungen des $V_{1/2}$ -Werts auf. Auch die übrigen Ionenkanalmutanten, für die keine Veränderung der Psora-4-Potenz gemessen wurde, zeigten positive und negative Veränderungen des $V_{1/2}$ -Werts. Somit war kein Zusammenhang zwischen einer Verschiebung des $V_{1/2}$ -Werts in die positive Richtung und einer Veränderung der Psora-4-Potenz nachzuweisen.

Die durch die Alanin-Scans identifizierten Aminosäuren gehören somit zur Psora-4 Bindungsstelle im Kv1.5-Ionenkanal.

3.2.6 Docking von Psora-4 in ein Kv1.5-Homologie-Modell

Es wurden computergestützte Liganden-Dockings mit einem Kv1.5-Homologiemodell durchgeführt, das auf der Kristallstruktur des homologen rKv1.2-Ionenkanals basiert, um mögliche Bindungskonformationen für Psora-4-Moleküle zu finden. Die Dockings wurden in Kollaboration mit Prof. Sansom (Department of Biochemistry, University of Oxford) durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass vier Psora-4-Moleküle in den vier hydrophoben Seitentaschen und zusätzlich ein Psora-4-Molekül in der zentralen Ionenkanalpore binden und

dabei mit dem Großteil der im Alanin-Scan identifizierten Aminosäuren interagieren (**Abb. 3.2.6-1a und b**).

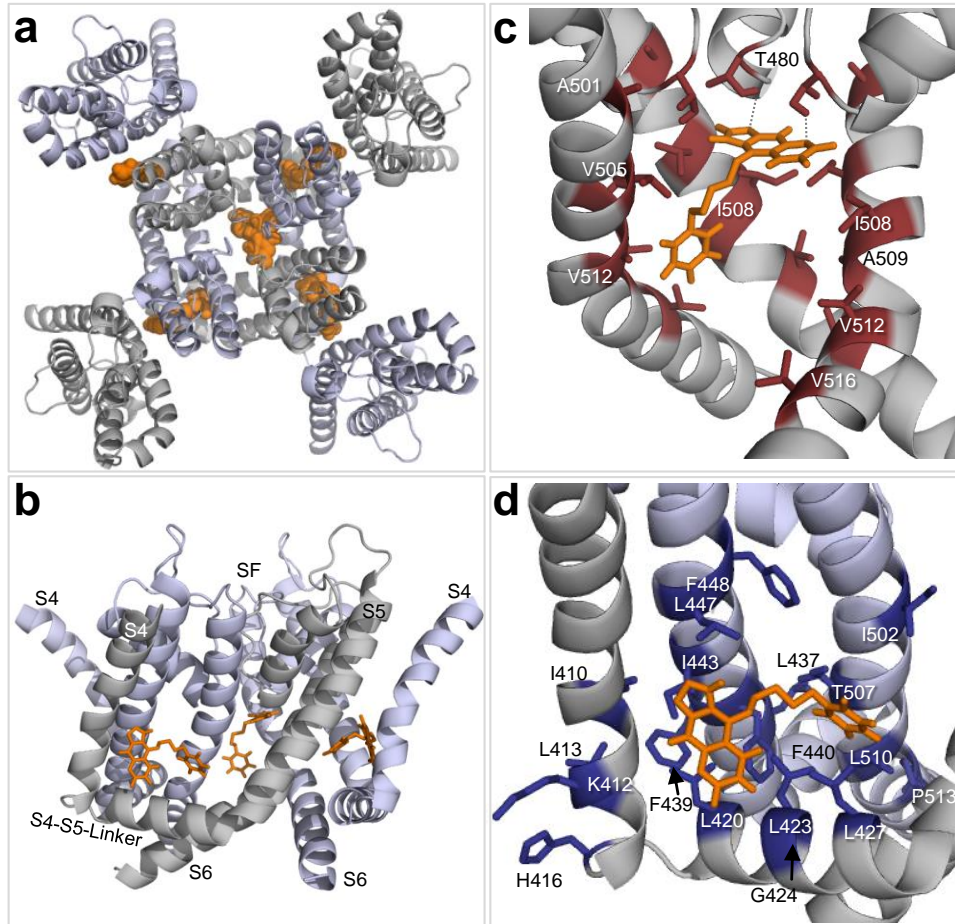


Abbildung 3.2.6-1: Docking von Psora-4 in ein Modell des Kv1.5-Ionenkanals

(a) Vier Untereinheiten des Kv1.5-Ionenkanals von extrazellulär betrachtet. Die Psora-4-Moleküle sind in orange dargestellt. Ein Psora-4-Molekül belegt die zentrale Kavität, vier weitere die hydrophoben Seitentaschen. (b) S4- bis S6-Segmente von drei Untereinheiten des Kv1.5-Ionenkanals von der Seite betrachtet. Ein Psora-4-Molekül ist in der zentralen Pore, zwei weitere sind in den hydrophoben Seitentaschen gezeigt (SF=Selektivitätsfilter). (c) Detailliertere Ansicht des Psora-4-Moleküls in der zentralen Pore. Die im Scan identifizierten Hits sind rot hervorgehoben und beschriftet. (d) Detailliertere Ansicht eines Psora-4-Moleküls in einer hydrophoben Seitentasche. Die Hits der Seitentasche sind blau markiert und beschriftet.

Die Dockings zeigten, dass sich die Cumarin-Struktur des Psora-4-Moleküls in der zentralen Pore nahe am Selektivitätsfilter befindet, so dass Wasserstoffbrückenbindungen mit T480 ausgebildet werden können (gestrichelte Linien in **Abb. 3.2.6-1c**). Die anderen Aminosäurereste, die zur Psora-4-Bindungsstelle gehören, befanden sich im S6-Segment: V505, I508, A509, V512, P513 und V516 lagen alle im Bereich von 4 Å um das Psora-4-Molekül. Die Aminosäuren A501 und I502 waren im Docking so weit vom Psora-4-Molekül entfernt, dass eine Interaktion zunächst nicht möglich schien. T507 und L510 sind auf der der Pore abgewandten Seite des S6-Segments lokalisiert. Es ist nicht möglich, dass ein Psora-4-Molekül, das in der zentralen Ionenkanalpore gebunden ist, gleichzeitig mit diesen Aminosäureresten interagiert.

Durch das Binden von Psora-4 wurde die engste Stelle in der zentralen Pore von 4 Å auf 2,6 Å reduziert, so dass die Passage von Kalium-Ionen verhindert wurde.

Die Aminosäurereste, mit denen Psora-4 in den hydrophoben Seitentaschen interagiert, waren größtenteils hydrophob. Im Bereich von 4 Å um das Psora-4-Molekül befanden sich: I410 und L413 (S4-Segment); L420, L423, G424 und L427 (S4-S5-Linker); L437, F440, I443, L447 und F448 (S5-Segment); und T507 und L510 (S6-Segment) (**Abb. 3.2.6-1d**).

3.2.7 Molekulardynamische Simulationen von Psora-4 in der zentralen Pore und den hydrophoben Seitentaschen

Um die dynamische Interaktion zwischen Psora-4 und dem Kv1.5-Ionenkanal über eine Zeitspanne von 100 µs zu beobachten, sind vier molekulardynamische Simulationen (Molecular dynamics simulation, MDs) in Kollaboration mit Prof. Sansom (Department of Biochemistry, University of Oxford) durchgeführt worden. Die MDss bestätigten größtenteils die Ergebnisse des Alanin-Scans und des Dockings (**Abb. 3.2.7-1a und b**).

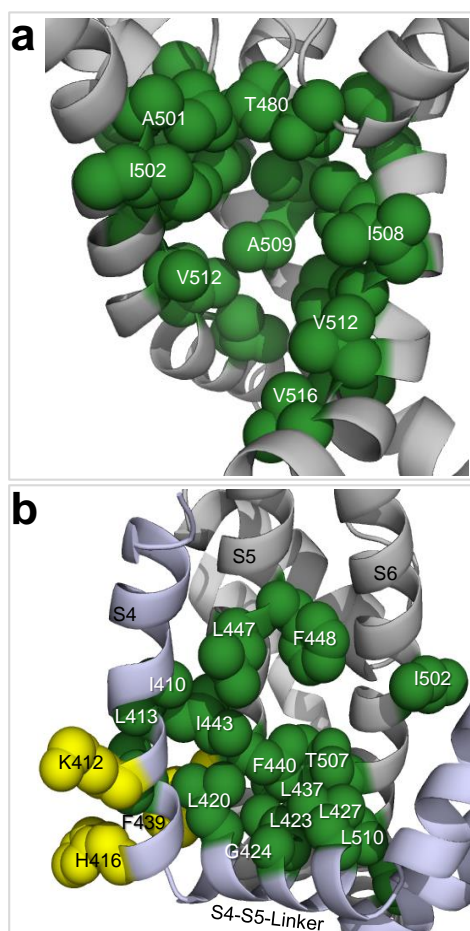


Abbildung 3.2.7-1: Ergebnis der MDss mit Psora-4 im Kv1.5-Ionenkanal

Ansicht (a) der zentralen Kavität und (b) der hydrophoben Seitentasche. Die durch MDss validierten Psora-4-Hits sind grün gezeigt. Hits des Alanin-Scans, die nicht durch MDss bestätigt wurden, sind gelb dargestellt.

Die MDss bestätigten für die zentrale Kavität eine Interaktion mit T480 (Porenschleife) und A501, I502, V505, I508, A509, V512, P513 und V516 (S6) (**Abb. 3.2.7-1a**). Die elektrophysiologischen Daten zeigten eine Interaktion zwischen Psora-4 und A501 sowie I502, die im Docking nicht bestätigt werden konnte. Die erhöhte Flexibilität der Psora-4-Moleküle ermöglichte in den MDss jedoch eine Annäherung an A501 und I502 bis auf 4 Å, so dass die MDSs zeigten, dass eine Interaktion möglich ist. Eine genaue Beschreibung der Interaktionen zwischen Psora-4 und den einzelnen Aminosäureresten findet sich in **Abb. 3.2.7-2**.

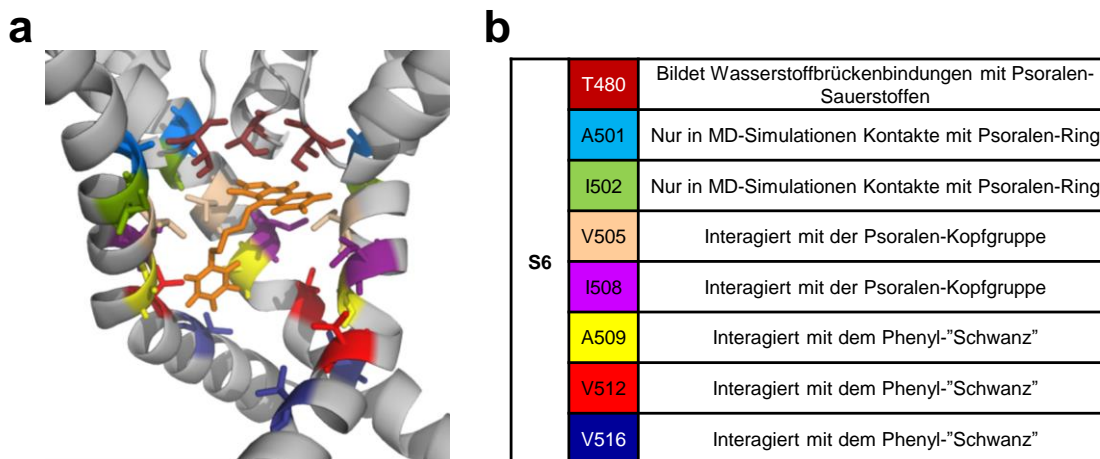


Abbildung 3.2.7-2: Übersicht über die Interaktionen von Psora-4 mit der zentralen Pore des Kv1.5-Ionenkanals

(a) Die zentrale Kavität des Kv1.5-Ionenkanals. Die Psora-4-Bindungsstelle ist farblich hervorgehoben. (b) Auflistung der Interaktionen der einzelnen Hits mit Psora-4. Farbkodierung wie in (a).

Für die hydrophoben Seitentaschen wurde in den MDss eine Interaktion des Psora-4-Moleküls mit I410 und L413 (S4); L420, L423, G424 und L427 (S4-S5-Linker); L437, F440, I443, L447 und F448 (S5) sowie T507 und L510 (S6) bestätigt (**Abb. 3.2.7-1b**). Mit F439 (S5) und K412 und H416 (S4) konnte kein Kontakt mit Psora-4 gezeigt werden, da die Reste dieser Aminosäuren sowohl im Docking als auch in den MDss aus der hydrophoben Seitentasche herausgedreht waren. Eine detaillierte Beschreibung der Interaktionen zwischen Psora-4 und den einzelnen Aminosäureresten findet sich in **Abbildung 3.2.7-3**.

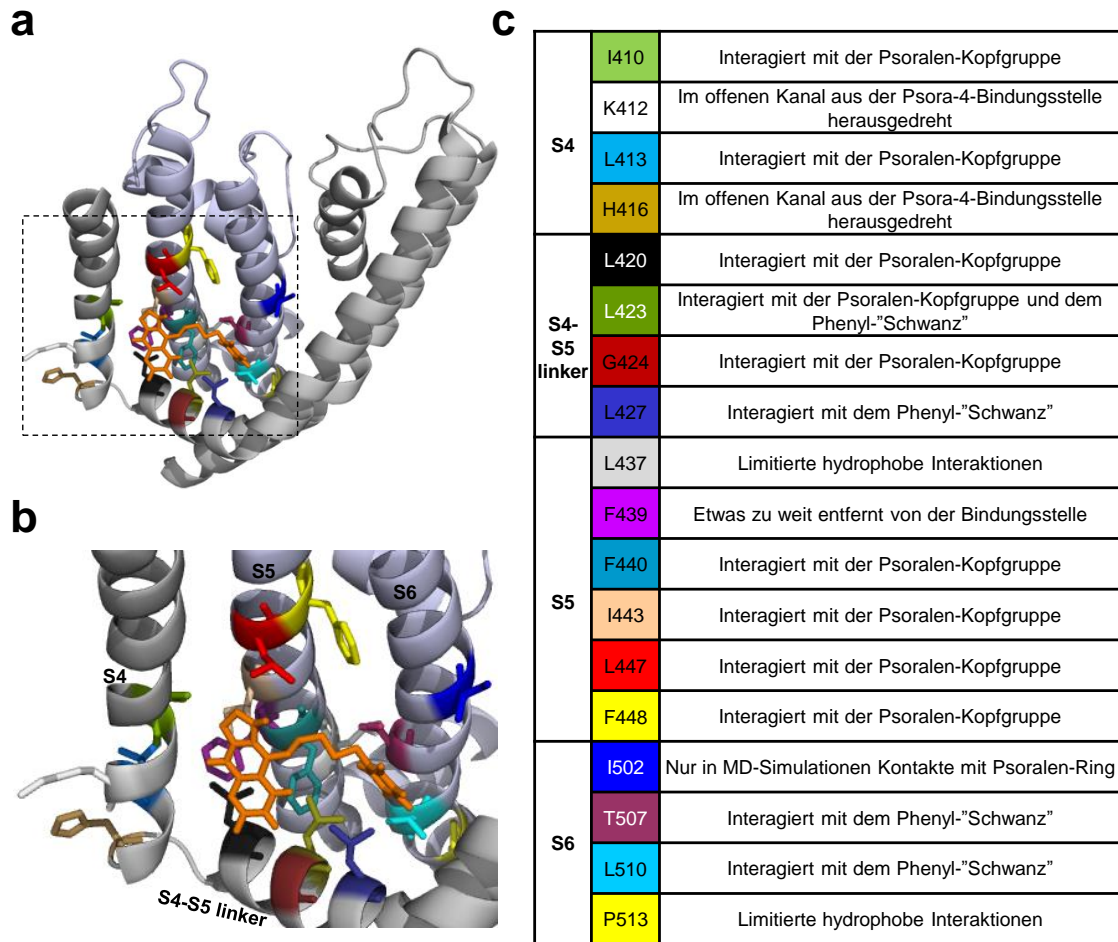


Abbildung 3.2.7-3: Übersicht über die Interaktionen von Psora-4 mit den hydrophoben Seitentaschen

(a) Die hydrophobe Seitentasche des Kv1.5-Ionenkanals. Die Psora-4-Bindungsstelle ist markiert. (b) Nahaufnahme von (a). (c) Auflistung der ermittelten Interaktionen der Hits und Psora-4. Farbkodierung wie in (a und b).

Das S4 ist der Hauptspannungssensor des Kv1.5-Ionenkanals. Während des Öffnens und Schließens bewegt es sich und vollzieht eine Drehbewegung. Das Docking und die MDss wurden mit einem Modell des offenen Ionenkanals durchgeführt und die geschlossene Konformation des Ionenkanals ist nicht im Detail bekannt. Weder das Docking noch die MDss konnten die Interaktion mit K412 und H416 bestätigen, jedoch aus den genannten Gründen auch nicht widerlegen. Die elektrophysiologischen Daten wiesen deutlich darauf hin, dass eine Interaktion zwischen K412 und H416 mit Psora-4 stattfindet. Die Flexibilität des S4-Segments erklärt auch die geringeren Änderungen des IC_{50} -Werts der S4-Segment-Mutanten (**Abb. 3.2.4-1d**).

Insgesamt bestätigten die MDss, dass 22 der 25 im Alanin-Scan identifizierten Aminosäuren mit Psora-4 in diesem Modell interagieren können.

3.2.8 Die nicht konservierten Seitentaschen ermöglichen die Psora-4 Kv1-Spezifität

Die zentrale Kavität der Kv-Kanäle ist hochkonserviert. Im Gegensatz dazu sind die hydrophoben Seitentaschen nur innerhalb der Kv1-Familie hochkonserviert. Sie unterscheiden sich zwischen den einzelnen Kv-Familien (**Abb. 3.2.8-1**) und könnten so die Kv1-Spezifität von Psora-4 erklären. Betrachtet man die im Alanin-Scan identifizierten Aminosäuren der Bindungsstelle in den hydrophoben Seitentaschen, so unterscheiden sich beispielsweise Kv2.1-Ionenkanäle und Kv1.5-Ionenkanäle an vier Stellen (blau in **Abb. 3.2.8-1**).

	S4	S4-S5-Linker	S5	Porenschleife	S6
hKv1.5	IFKLSRHSK	GLQILGKTLQ	ELGLLIFFLFIFGVIL	TTVGYG	GSLCAIAGVLTIALPVPVIV
hKv2.1	ILKLARHST	GLQSLGFTLR	ELGLLIIFLAMGIMI	TTVGYG	GGLCCIAGVLVIALPIPIIV
hKv2.1 ST	ILKLARHST	GLQSLGFTLR	ELGLLIFFLAIGIML	TTVGYG	GGLCCIAGVLTIALPVPPIIV
hKv2.1 ST+ZK	ILKLARHST	GLQSLGFTLR	ELGLLIFFLAIGIML	TTVGYG	GGLCAIAGVLTIALPIPIIV
	* * *	* * *	* ↑439 ↑443 ↑447	*	↑501 * * * * ↑512 *

Abbildung 3.2.8-1: Konservierung der Psora-4-Bindungsstelle im Kv1.5- und Kv2.1-Ionenkanal

Sequenzvergleich des Kv1.5- und des Kv2.1-Ionenkanals und den Kv2.1 ST-, sowie Kv2.1 ST+ZK-Ionenkanalmutanten. Konservierte Bestandteile der Psora-4-Bindungsstelle sind mit Sternchen markiert. Die eingefügten Mutationen der Seitentaschen sind blau, die der zentralen Kavität rot markiert.

Diese geringer konservierten Psora-4-Bindungsstellen könnten daher das molekulare Korrelat für die beobachtete Kv1-Spezifität von Psora-4 sein. Wie bereits oben gezeigt, inhibierten 500 nM Psora-4 den Kv1.5-Ionenkanal zu ca. 75 %, während der Kv2.1-Ionenkanal nur zu ca. 3 % inhibiert wurde (**Abb. 3.2.8-2a und b**).

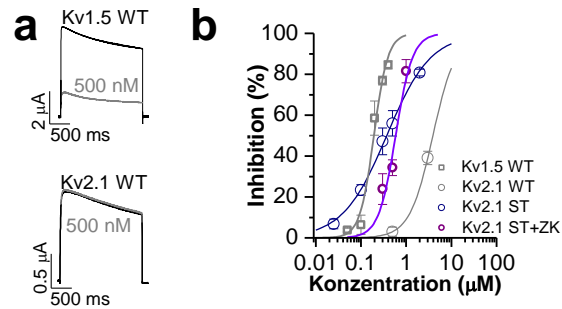


Abbildung 3.2.8-2: Das Einbringen von Kv1.5-ähnlichen Seitentaschen ermöglicht eine Inhibition durch Psora-4

(a) Repräsentative Messungen des Kv1.5- und Kv2.1-Ionenkanals vor und nach Applikation von 500 nM Psora-4. (b) Konzentrations-Wirkungskurven der Kv1.5-, Kv2.1-, Kv2.1 ST- und Kv2.1 ST+ZK-Kanäle ($n = 3-5$). Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt.

Um die These zu überprüfen, dass die Unterschiede in der hydrophoben Seitentasche für die Kv1-Spezifität von Psora-4 verantwortlich sind, wurden die vier abweichenden Aminosäuren der Bindungsstelle in den hydrophoben Seitentaschen im Kv2.1-Ionenkanal mittels zielgerichteter Mutagenese substituiert, so dass eine Kv1.5-Seitentaschen-Bindungsstelle eingeführt wurde (Kv2.1 Seitentasche, ST) (**Abb. 3.2.8-1**). Anschließend wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve des Kv2.1 ST-Ionenkanals erstellt und mit der der WT-Ionenkanäle abgeglichen (**Abb. 3.2.8-2b**). Der IC_{50} -Wert des Kv1.5-Ionenkanals lag bei 0,19 μ M, der des Kv2.1-Ionenkanals bei 3,9 μ M. Die Affinität von Psora-4 an den Kv2.1 ST-Ionenkanal konnte im Gegensatz zur Affinität an den Kv2.1 WT-Ionenkanal deutlich erhöht und an die des Kv1.5-Ionenkanal angenähert werden. Der IC_{50} -Wert des Kv2.1 ST-Ionenkanals lag bei 0,37 μ M, was einer ca. 10-fachen Veränderung gegenüber dem Kv2.1-WT-Ionenkanal entspricht (**Abb. 3.2.8-2b**). Somit bestätigte das Experiment die These, dass die hydrophoben Seitentaschen die Grundlage für die Kv1-Spezifität von Psora-4 darstellen.

Während die Konzentrations-Wirkungskurve eine erhöhte Psora-4-Affinität für den Kv2.1 ST-Ionenkanal zeigte, fehlte jedoch die hohe Kooperativität, die durch eine sehr steile Konzentrations-Wirkungskurve und einen hohen Hill-Koeffizienten gekennzeichnet ist. Daher wurden die beiden Aminosäuren der Psora-4-Bindungsstelle in der zentralen Kavität, die sich zwischen Kv2.1- und

Kv1.5-Ionenkanal unterscheiden, ebenfalls mutiert, so dass die sechsfache Mutante Kv2.1 Seitentasche und zentrale Kavität (Kv2.1 ST+ZK) entstand (**Abb. 3.2.8-1**). Die Konzentrations-Wirkungskurve des Kv2.1 ST+ZK-Ionenkanals zeigte ebenfalls die erhöhte Psora-4-Affinität (**Abb. 3.2.8-2b**). Der IC_{50} -Wert lag bei 0,58 μ M, mit einem Hill-Koeffizienten von 2,3. Somit konnte die hohe Kooperativität durch die zusätzlichen Mutationen in den Kv2.1 ST+ZK-Ionenkanal eingefügt werden. Dies zeigte, dass die hohe Kooperativität nur dann vorliegt, wenn beide Bindungsstellen intakt sind, die in der zentralen Pore und die in den Seitentaschen.

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, wie viele der Bindungsstellen in den vier hydrophoben Seitentaschen in jedem Ionenkanal intakt sein müssen, damit Psora-4 den Ionenkanal inhibieren kann. Durch die Ko-Expression von Kv1.5-WT-Ionenkanälen und Ionenkanälen mit mutierten Seitentaschen konnte gezeigt werden, dass Psora-4 die Ionenkanäle nicht mehr inhibieren konnte, wenn 25 % der hydrophoben Seitentaschen keine intakte Bindungsstelle aufwiesen. Es wurden also alle vier Seitentaschen für eine hohe Psora-4-Affinität benötigt (**Abb. 3.2.8-3**).

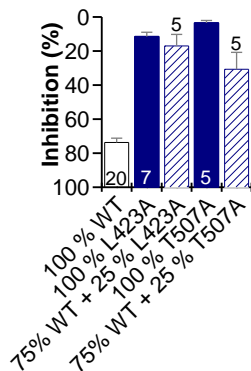


Abbildung 3.2.8-3: Ko-Expressionen von Kv1.5-WT- und mutierten Ionenkanälen

Inhibition von Kv1.5-WT-Ionenkanälen (weiß), Ionenkanalmutanten der Seitentaschen (blau) und gemischten Ionenkanälen (gestreift) durch Applikation von 500 nM Psora-4 (n= Zahlen in den Balken). Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt.

Außerdem wiesen die Ionenkanalmutanten der zentralen Kavität oder der Seitentaschen mit verringerter Psora-4-Affinität einen Hill-Koeffizienten von ca. 1 auf. Beispiele aus jedem untersuchten Segment sind in **Abb. 3.2.8-4a** gezeigt. Auf die Besonderheit von I502A wird im nächsten Abschnitt weiter eingegangen. Wurde also durch Mutation eine der Bindungsstellen, entweder die in der zentralen Kavität oder die in den Seitentaschen zerstört, so entfiel auch die hohe Kooperativität. Das wies darauf hin, dass nur durch die gleichzeitige Interaktion mit der zentralen Kavität und den vier Seitentaschen

die hohe Psora-4-Affinität gegeben ist. Das Binden an die eine Bindungsstelle vereinfachte das Binden an die andere. Anschaulich wird dieses Ergebnis, da die Psora-4-Moleküle von beiden Seiten an die S6-Segmente banden und eine Struktur formten, die an ein Sandwich erinnerte (**Abb. 3.2.8-4b**).

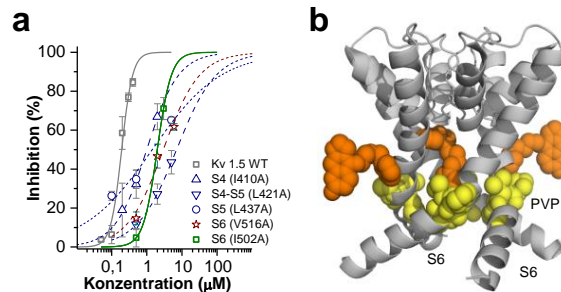


Abbildung 3.2.8-4: Auswirkung einer Mutation in einer der Bindungsstellen auf die Konzentrations-Wirkungskurve

(a) Konzentrations-Wirkungskurven von Kv1.5-WT-Ionenkanälen und exemplarisch einer Ionenkanalmutante mit signifikant verringerter Psora-4-Affinität pro Segment ($n = 3-22$). Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt (b) Vier S6-Segmente und Porenschleifen des Kv1.5-Ionenkanals bilden die zentrale Pore. Das PVP ist gelb hervorgehoben, Psora-4-Moleküle sind in orange gezeigt.

3.2.9 Laterale Fenster zwischen der zentralen Kavität und den hydrophoben Seitentaschen fungieren als „Durchgang“ für Psora-4-Moleküle

Psora-4-Moleküle sind hydrophob, so dass es unwahrscheinlich ist, dass sie die Bindungsstelle in der zentralen Pore über die flüssige Phase erreichen. Wahrscheinlicher ist es, dass sie sich in der Zellmembran und zwischen den Segmenten des Ionenkanals bewegen. In Kollaboration mit Prof. Sansom (Department of Biochemistry, University of Oxford) wurden 50 ns MDss durchgeführt, wobei die Startposition von Psora-4 in der Membran, extrazellulär oder an der Grenze zwischen beidem lag. In allen Simulationen lagerte sich Psora-4 ca. 10 Å von der Mitte der Zellmembran entfernt an (**Abb. 3.2.9-1a**). Wenn Psora-4 sich in den hydrophoben Seitentaschen befand, war es 3,6 Å von der Mitte der Zellmembran entfernt (**Abb. 3.2.9-1b**). Die Psora-4-Moleküle interagierten weiterhin vor allem mit dem inneren hydrophoben Teil der

Zellmembran und nicht mit den geladenen Kopfgruppen. Die MDss wiesen darauf hin, dass Psora-4 wahrscheinlich durch die Membran, die hydrophoben Seitentaschen und schließlich durch die lateralen Fenster die Bindungsstelle in der zentralen Pore erreichen könnte. Dafür spricht auch, dass der Beginn der Inhibition durch Psora-4 in den „first pulse“-Experimenten langsam war. Blocker, die im offenen Zustand des Ionenkanals die zentrale Pore blockieren, weisen häufig einen sehr schnellen Beginn des Blocks auf. Der langsame Beginn des Blocks von Psora-4 wies darauf hin, dass die Kavität nicht schnell über die flüssige Phase erreicht wurde, sondern langsam und limitiert durch die Diffusionsgeschwindigkeit über die lipophile Zellmembran und die Bereiche innerhalb des Ionenkanals.

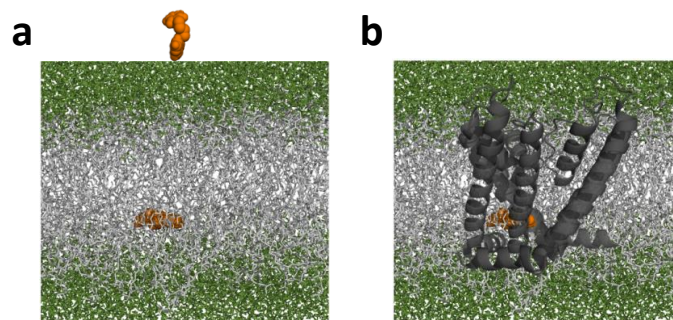


Abbildung 3.2.9-1: Ergebnis der 50 ns MDss: Psora-4 lagert sich in der Membran an

(a) Psora-4 ist orange dargestellt. Der Startpunkt des Psora-4-Moleküls lag außerhalb der Membran, später befindet sich Psora-4 in der Mitte der Membran. (b) Ausschnitt aus (a) mit einem Modell des Kv1.5-Ionenkanals. Die Seitentaschen liegen etwa auf der Höhe des Psora-4-Moleküls.

Die lateralen Fenster wurden in der Kristallstruktur des NavAB-Ionenkanals als recht große Öffnungen beschrieben (Payandeh et al, 2011). Der NavAB-Ionenkanal wurde im aktivierten, aber nicht geöffneten Zustand kristallisiert, während der rKv1.2-Ionenkanal im offenen Zustand kristallisiert wurde (Long et al, 2005). Die lateralen Fenster finden sich ebenfalls, wenn auch sehr viel kleiner, in der rKv1.2-Kristallstruktur. Das Erstellen eines Kv1.5-Homologiemodells auf Basis der NavAB-Kristallstruktur (**Abb. 3.2.9-2a**) im Vergleich zum Kv1.5-Homologiemodell auf Basis der rKv1.2-Kristallstruktur (**Abb. 3.2.9-2b**) zeigte, dass in beiden Modellen die lateralen Fenster in unterschiedlicher Größe vorhanden und I502 und auch L437 in diese

hingeleitet sind. Die hydrophoben Seitentaschen sind mit der zentralen Kavität durch die lateralen Fenster verbunden.

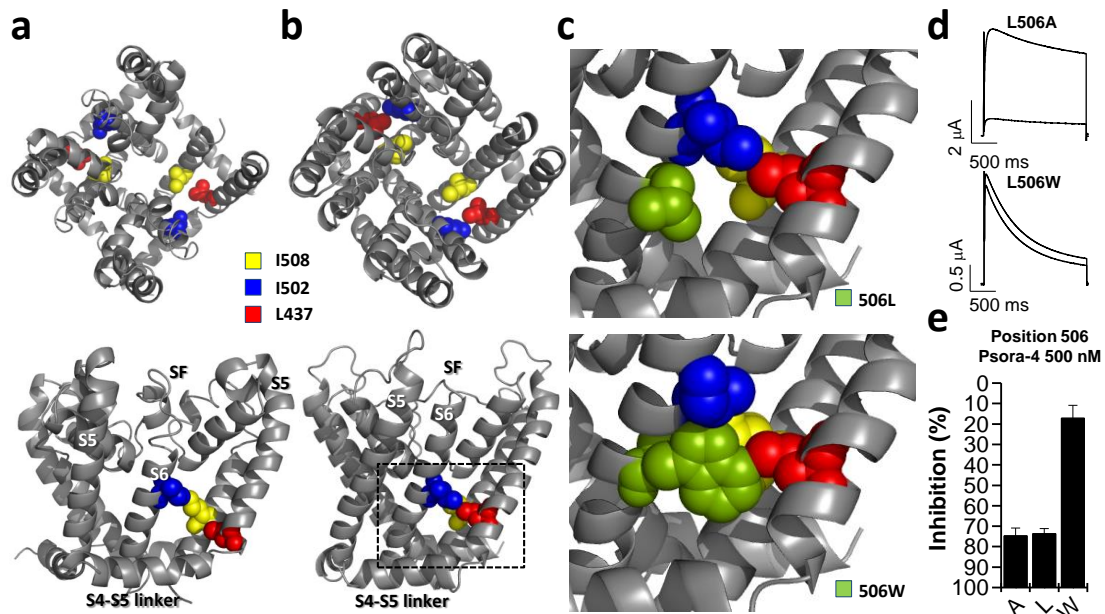


Abbildung 3.2.9-2: Laterale Fenster fungieren als „Durchgang“ zwischen der zentralen Kavität und den hydrophoben Seitentaschen

(a-b) Die porenformenden Domänen des Kv1.5-Ionenkanals basierend auf (a) der Kristallstruktur des aktivierten, nicht offenen NavAB-Ionenkanals und (b) der Kristallstruktur des offenen rKv1.2-Ionenkanals. Die oberen Darstellungen betrachten den Ionenkanal von extrazellulär, die unteren seitlich. Hervorgehoben sind die Aminosäurereste von I502 und L437, die in die lateralen Fenster gerichtet sind. Zur Orientierung ist außerdem I508 und damit die zentrale Pore markiert. Die gestrichelte Linie gibt den Ausschnitt für (c) vor. (c) Vergrößerter Ausschnitt aus (b). Zusätzlich ist im oberen Bild der Rest der Aminosäure L506 in grün gezeigt. Unten ist die Mutation L506W dargestellt, die das Fenster verschließt. (d) Beispielmessungen der L506A- und L506W-Ionenkanalmutanten. (e) Inhibition von Ionenkanälen mit unterschiedlichen Aminosäuren an Position 506 durch 500 nM Psora-4 ($n = 3-20$). Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt.

Die Ionenkanalmutante I502A stellte eine Ausnahme dar. Obwohl die Psora-4-Affinität verringert war, verlief die Konzentrations-Wirkungskurve ähnlich steil wie bei Kv1.5-WT (**Abb. 3.2.8-4a**). Die Mutation I502A zerstört nicht eine der Bindungsstellen, sondern den Durchgang zwischen der zentralen Kavität und den hydrophoben Seitentaschen (**Abb. 3.2.9-2a und b**). Diese Ergebnisse passen zu den „first-pulse“-Experimenten, die darauf hinwiesen, dass

repetitives Öffnen des Ionenkanals für die Blockade durch Psora-4 notwendig ist. Die unterschiedliche Größe der lateralen Fenster und damit des „Durchgangs“ für Psora-4 in den unterschiedlichen Zuständen des Ionenkanals könnten dies erklären. Um dies zu prüfen, wurde die Aminosäure L506, die sich in der Nähe der lateralen Fenster befindet, aber deren Substitution durch Alanin (L506A) keine Auswirkungen auf die Psora-4-Inhibition hatte, durch Tryptophan ersetzt (L506W). Da Tryptophan einen großen Rest aufweist, könnten so die lateralen Fenster versperrt werden (**Abb. 3.2.9-2c**). Wie erwartet konnten L506W-Ionenkanäle nicht mehr durch Psora-4 inhibiert werden (**Abb. 3.2.9-2d und e**). Dieses Ergebnis unterstreicht deutlich die Bedeutung der lateralen Fenster für den Psora-4-Block.

3.2.10 Psora-4 interagiert mit der Porenschleife

Einige der MDss zeigten, dass das Psora-4-Molekül in den hydrophoben Seitentaschen eine Konformation annehmen kann, in der es mit den im Alanin-Scan identifizierten Aminosäureresten interagieren kann und zusätzlich bis zu den Porenschleifen reicht (**Abb. 3.2.10-1**). Außerdem ergaben die MDss Kontakte zwischen Psora-4 und M478, der Aminosäure, die sich vor der charakteristischen Porensignatursequenz „GYG“ in der Porenschleife befindet (MTTVGYG).

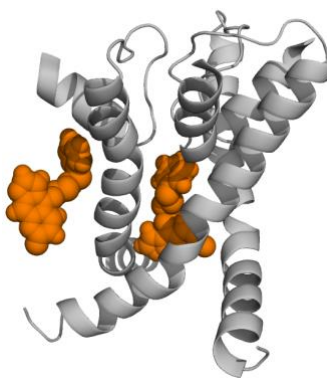


Abbildung 3.2.10-1: Psora-4 erreicht die Porenschleife des Ionenkanals

Ergebnis der MDss. Gezeigt sind drei S6-Segmente und die zugehörigen Porenschleifen. Psora-4 ist orange dargestellt. Ein Psora-4-Molekül bindet in der zentralen Kavität, ein weiteres in einer hydrophoben Seitentasche. Dieses erreicht aus dieser Position die „Rückseite“ der Porenschleife.

Um den Ergebnissen der MDss nachzugehen, wurde zusätzlich ein Alanin-Scan der Porenhelix von F471A-M478A durchgeführt. Repräsentative Beispiele der Messungen sind in **Abb. 3.2.10-2a** gezeigt. Die Mutanten W473A, V476A und

M478A zeigten eine signifikant ($p < 0,001$) verringerte Inhibition und erhöhte IC_{50} -Werte bei Applikation von Psora-4 (**Abb. 3.2.10-2a-c**). Somit bestätigten die elektrophysiologischen Daten die Ergebnisse der MDss.

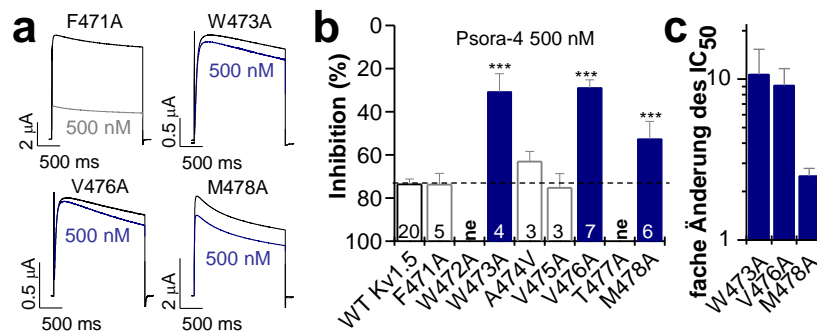


Abbildung 3.2.10-2: Die Interaktion von Psora-4 mit der Porenhelix

(a) Repräsentative Beispiele von Messungen vor und nach Applikation von 500 nM Psora-4 des Alanin-Scans der Porenschleife. (b) Alanin-Scan der Porenschleife (n=Zahlen in den Balken). (c) Verschiebungen der IC_{50} -Werte der Ionenkanalmutanten der Porenschleife. Gemessen wurden 3-5 Psora-4-Konzentrationen mit je 3-7 Einzelmessungen. In der Abbildung sind die Werte als Mittelwert und SEM gezeigt ($p < 0,001$: ***).

Messungen mit der Kontrollsubstanz Bupivacain ergaben, dass alle Mutanten durch Bupivacain blockierbar sind (**Abb. 3.2.10-3a**). Keine Korrelation gab es außerdem zwischen der Inaktivierung der mutierten Ionenkanäle und der gemessenen Inhibition durch 500 nM Psora-4 (**Abb. 3.2.10-3b**).

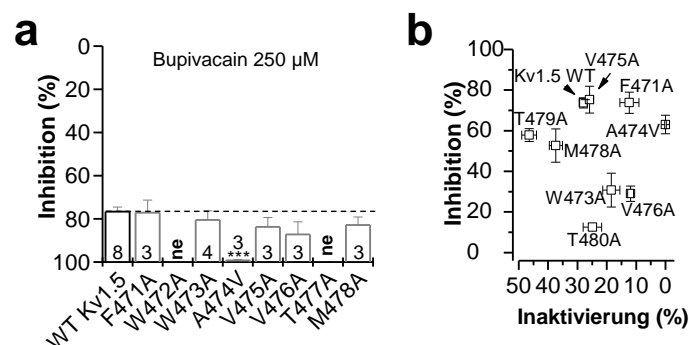


Abbildung 3.2.10-3: Kontrollexperimente zum Alanin-Scan der Porenschleife

(a) Kontroll-Alanin-Scan der Porenschleife mit 250 μ M Bupivacain (n=Zahlen in den Balken). (b) Die Inhibition durch 500 nM Psora-4 korreliert nicht mit der Inaktivierung der Ionenkanalmutanten (n = 3-15). In der Abbildung sind die Werte als Mittelwert und SEM gezeigt ($p < 0,001$: ***).

Außer einer Interaktion mit M478 wiesen die MDss auch auf eine Interaktion mit der Aminosäure A503 im S6-Segment hin. A503 befindet sich auf der der Pore abgewandten Seite im oberen Bereich des S6-Segments. Der Alanin-Scan des S6-Segments ergab für A503V nur eine geringfügige Änderung der Psora-4-Affinität. Durch die Substitution von A503 durch Aminosäuren mit größerem Rest (Leuzin oder Isoleuzin) wurde die Psora-4-Affinität verringert (**Abb. 3.2.10-4a und b**). Der IC_{50} -Wert für A503L erhöhte sich gegenüber dem des Kv1.5-WTs um das ca. 100-fache (**Abb. 3.2.10-4b**).

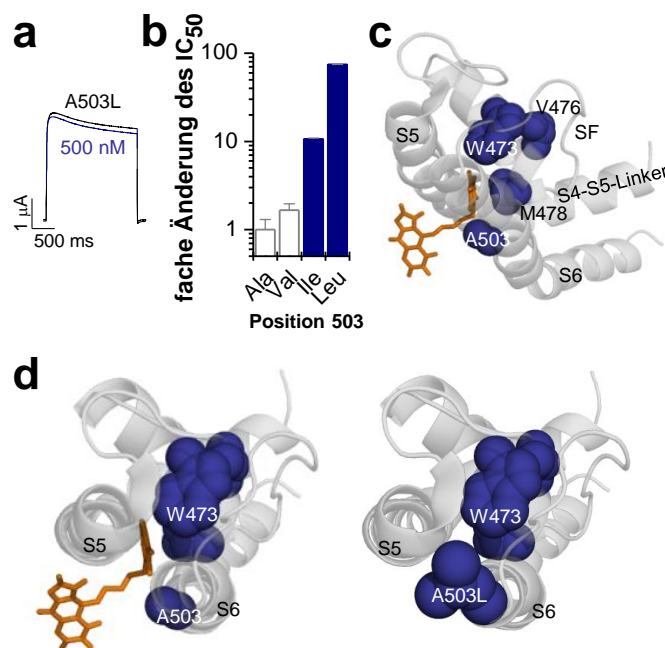


Abbildung 3.2.10-4: Die Interaktion von Psora-4 mit A503

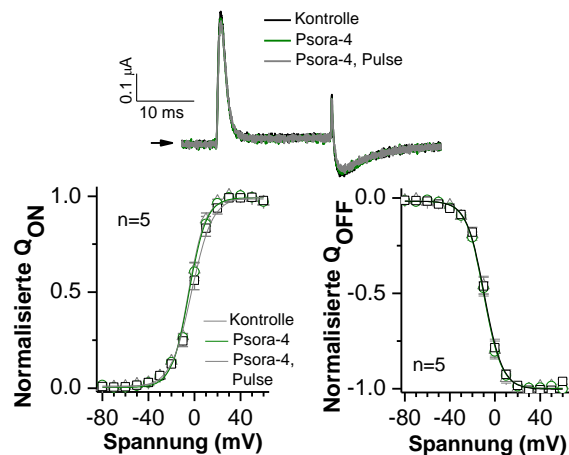
(a) Repräsentatives Beispiel einer Messung der Ionenkanalmutante A503L vor und nach Applikation von Psora-4. (b) Änderungen der IC_{50} -Werte für Ionenkanalmutanten der Position 503. Gemessen wurden 2-5 Psora-4-Konzentrationen mit je 3-20 Einzelmessungen. Gezeigt sind Mittelwert und SEM. (c) Die Porendomänen einer Untereinheit des Kv1.5-Ionenkanals sind von schräg oben (extrazellulär) gezeigt. Psora-4 ist orange dargestellt. Die identifizierten Hits sind blau hervorgehoben, SF = Selektivitätsfilter. (d) Ausschnitt des Ionenkanals und Farbkodierung wie in (c). Die Perspektive ist ebenfalls von schräg oben. Psora-4 ist in orange gezeigt. Links ist die Position von A503 gezeigt, die den Durchgang zur Porenschleife markiert. Rechts ist die Mutation A503L dargestellt, die diesen Durchgang blockiert.

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Psora-4-Seitenkette zwischen dem S5- und S6-Segment interkaliert und so der Phenylring die Porenhelix erreichen kann (**Abb. 3.2.10-4c**). Dies erklärt auch, warum die Länge der Seitenkette für die Affinität von Psora-4 von entscheidender Bedeutung ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Länge von **vier** $-CH_2-$ optimal ist (das Molekül wird aus diesem Grund als Psora-**4** bezeichnet) (Vennekamp et al, 2004). Verhindert eine große Aminosäure an der Position 503, dass die Psora-4-Seitenkette die Porenhelix erreicht, so ist die Affinität drastisch verringert (**Abb. 3.2.10-4d**). Auch diese Ergebnisse bestätigen, dass die Interaktion von Psora-4 mit der Porenhelix ein wichtiger Bestandteil des Inhibitionsmechanismus ist.

3.2.11 Die Inhibition durch Psora-4 verhindert nicht das „Gating“ des Ionenkanals, löst keine elektromechanische Entkopplung aus und ist nicht spannungsabhängig

Zur Psora-4-Bindungsstelle gehören Aminosäuren, die homolog zu den „ILT“-Aminosäuren und denen des „internal clusters“ sind. Es wurde beschrieben, dass die Mutation dieser Aminosäuren zu einer Entkopplung der Bewegung des Spannungssensors durch eine Änderung der Membranspannung und der Bewegung der Porensegmente führt, die die Pore öffnen oder schließen (Ledwell & Aldrich, 1999; Smith-Maxwell et al, 1998; Soler-Llavina et al, 2006). Da Psora-4 in den hydrophoben Seitentaschen bindet und dabei mit dem S4-Segment interagiert, lag es nahe, dass Psora-4 das S4-Segment möglicherweise arretieren könnte und so die Inhibition auslöst. Alternativ wäre es auch denkbar, dass Psora-4 in den hydrophoben Seitentaschen mit dem S4-Segment interagiert und dabei eine elektromechanische Entkopplung auslöst. Um den Inhibitionsmechanismus weiter aufzuklären, wurden die „gating currents“ vor und nach Applikation von Psora-4 untersucht. Die Untersuchung der „gating currents“ wurde in Kollaboration mit Prof. Sanguinetti (Nora Eccles Harrison Cardiovascular Research and Training Institute and Department of Physiology, University of Utah) mit der COVG (cut-open oocyte voltage gap)-Technik (Stefani & Bezanilla, 1998) durchgeführt. Die „gating currents“ wurden bei +60 mV vor der Applikation von Psora-4 („Kontrolle“), nach der Applikation

von Psora-4 und 15 pulsfreien Minuten („Psora-4“) und nach anschließenden 20 Pulsen zu +60 mV („Psora-4 Pulse“) gemessen. Der Zusammenhang zwischen den „gating currents“, die während der Aktivierung (Q_{on}) und denen, die während der Deaktivierung (Q_{off}) flossen, und der angelegten Membranspannung (QV-Beziehung) änderten sich durch die Applikation von Psora-4 nicht (**Abb. 3.2.11-1**).



	Kontrolle	Psora-4	Psora-4, Pulse
ON $V_{1/2}$	-3.0 ± 1.0 mV	-2.7 ± 1.2 mV	-1.5 ± 1.4 mV
ON k	$+7.0 \pm 0.4$ mV	$+7.3 \pm 0.6$ mV	$+7.7 \pm 0.9$ mV
OFF $V_{1/2}$	-8.7 ± 1.3 mV	-9.2 ± 1.0 mV	-8.5 ± 1.5 mV
OFF k	$+6.9 \pm 0.5$ mV	$+7.2 \pm 0.5$ mV	$+6.9 \pm 0.5$ mV

Abbildung 3.2.11-1: Psora-4 beeinflusst die QV-Beziehung nicht

Die „gating currents“ des Kv1.5-Ionenkanals werden durch die Applikation von 500 nM Psora-4 nicht verändert. Oben ist ein repräsentatives Beispiel einer Messung gezeigt. Die Pulse hatten eine Länge von 20 ms und das Haltepotential lag bei -90 mV. Unten links sind die „gating currents“ während der Aktivierung (Q_{on}), rechts die während der Deaktivierung gezeigt (Q_{off}). Die Werte sind als Mittelwerte und SEM gezeigt. Die Daten wurden mit einer Boltzmann-Funktion analysiert, um den Wendepunkt ($V_{1/2}$) und den Steigungsfaktor (k) vergleichen zu können. Die genauen Werte können der Tabelle entnommen werden.

Dies zeigte, dass sich das S4-Segment ungehindert in Abhängigkeit von der angelegten Membranspannung bewegen kann und nicht durch Psora-4 arretiert wird. Die anhaltende Flexibilität des S4-Segments passt zu den geringeren

Veränderungen der IC_{50} -Werte der S4-Segment-Mutanten im Vergleich zu denen der Ionenkanalmutanten anderer Segmente. Außerdem zeigten die MDss verschiedene mögliche Bindungskonformationen, in denen Psora-4 auch die Porenschleife erreichen kann. Auch eine Interaktion mit den S4-Mutanten K412 und H416 könnte nur bei einer entsprechenden Rotation des S4-Segments stattfinden.

Würde Psora-4 zu einer elektromechanischen Entkopplung führen, so müsste der Zusammenhang zwischen der Leitfähigkeit und der angelegten Membranspannung (GV-Beziehung) in positiver Richtung verschoben sein. Die Messung der GV-Beziehung vor und nach Applikation von Psora-4 zeigte keine Veränderung (**Abb. 3.2.11-2a und b**).

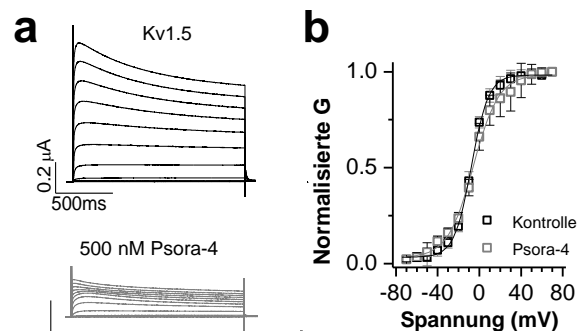


Abbildung 3.2.11-2: Psora-4 beeinflusst die GV-Beziehung nicht

(a) Repräsentatives Beispiel einer Messung des Kv1.5-Ionenkanals bei Potentialen zwischen -70 mV und +70 mV vor und nach Applikation von 500nM Psora-4. (b) Psora-4 verändert nicht die Abhängigkeit der Leitfähigkeit G von der Spannung V (GV). Die Werte sind als Mittelwerte und SEM gezeigt (n = 4-5).

Es wurde vermutet, dass Psora-4 bevorzugt an den inaktivierten Zustand des Ionenkanals bindet (Vennekamp et al, 2004). Die bisherigen Ergebnisse widersprechen dem, da kein Zusammenhang zwischen der Inaktivierung der Mutanten und der Inhibition durch Psora-4 vorlag. Es wurde nun zusätzlich der Zusammenhang zwischen Inhibition und angelegter Membranspannung untersucht. Würde der inaktivierte Zustand bevorzugt, so müsste die Inhibition bei stärkerer Depolarisation steigen. Das Ergebnis ist eindeutig: Die Psora-4-Inhibition ist nicht spannungsabhängig (**Abb. 3.2.11-3**).

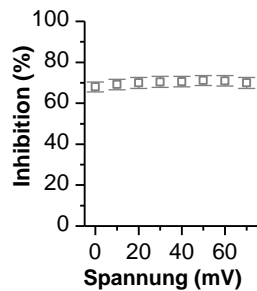


Abbildung 3.2.11-3: Die Inhibition durch Psora-4 ist nicht spannungsabhängig

Aufgetragen ist die Inhibition des Kv1.5-Ionenkanals durch 500 nM Psora-4 in Abhängigkeit von der angelegten Spannung während des Testpulses. Die Werte sind als Mittelwerte und SEM gezeigt (n = 4).

3.2.12 Der Psora-4-Inhibitionsmechanismus

Zur weiteren Aufklärung des Inhibitionsmechanismus, der der Psora-4-Inhibition zugrunde liegt, wurden in Kollaboration mit Prof. Baukrowitz (Institut für Physiologie, Universität Kiel) „inside-out macropatch“-Experimente durchgeführt. Im Gegensatz zu den TEVC-Experimenten mit ganzen Oozyten reichte hier eine Konzentration von 10 nM Psora-4 für eine Inhibition der Kv1.5-Ionenkanäle aus, wobei sich die Inhibition durch viele Pulse akkumulierte (**Abb. 3.2.12-1a**). Die Applikation von höheren Psora-4-Konzentrationen führte zu einer zeitabhängigen Inhibition, die typisch für Blocker des offenen Ionenkanals („open channel blocker“) ist (**Abb. 3.2.12-1b**). Die volle Inhibition wurde innerhalb von 2s-Pulsen erreicht. Die unterschiedlichen Zeitverläufe der Inhibition bei unterschiedlichen Konzentrationen sind ebenfalls charakteristisch für einen Blocker des offenen Ionenkanals. Weiterhin lösen sich Blocker des offenen Ionenkanals typischerweise während der Repolarisation innerhalb von Millisekunden vom Ionenkanal. Im Gegensatz dazu war dieser Prozess hier deutlich langsamer und unvollständig (**Abb. 3.2.12-1c**): Während der Psora-4-Applikation war lediglich eine geringe Regenerierung der Stromamplitude festzustellen. Auch wenn Psora-4 im Anschluss an eine Applikation ausgewaschen wurde, regenerierte die Stromamplitude auch nach 30 Minuten nur teilweise.

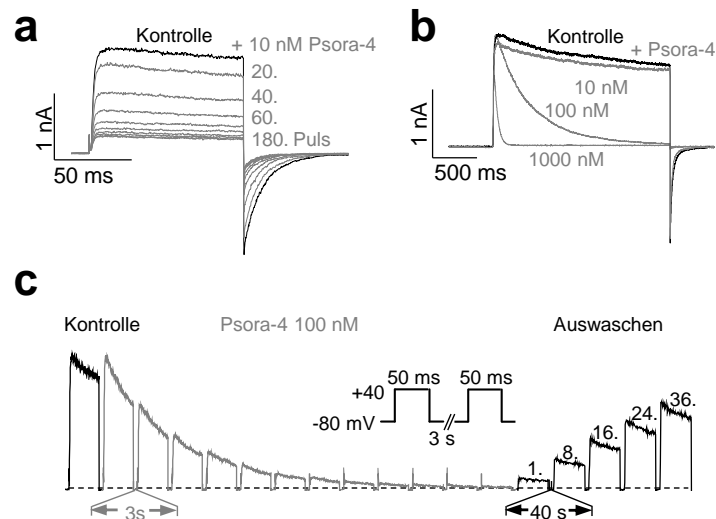


Abbildung 3.2.12-1: Der Psora-4-Inhibitionsmechanismus: Charakterisierung des Psora-4-Blocks

(a-b) Inhibition des Kv1.5-Ionenkanals mit (a) geringen Psora-4-Konzentrationen und (b) unterschiedlichen Psora-4-Konzentrationen. (c) Zeitverlauf des Ein- und Auswaschens von Psora-4. Die Zahlen auf den Stromamplituden geben die Nummer des Testpulses an.

Die Analyse des Zeitverlaufs des Beginns des Psora-4-Blocks ergab für den Kv1.5-WT-Ionenkanal sowie die Seitentaschen-Mutanten L423A und T507A keine Veränderung, jedoch konnte für die Mutante I508A der zentralen Kavität eine deutliche Verlangsamung ermittelt werden (**Abb. 3.2.12-2**). Der schnelle Beginn des Psora-4-Blocks, der bei Applikation von höheren Psora-4-Konzentrationen beobachtet wurde, ist folglich auf die Bindung von Psora-4 in der zentralen Kavität zurückzuführen. Die Regenerierung des Stroms des Kv1.5-WT-Ionenkanals von der Psora-4-Inhibition war sehr langsam, während alle drei mutierten Ionenkanäle eine schnelle Regenerierung innerhalb von 12 Sekunden zeigten (**Abb. 3.2.12-2**). Durch das Einfügen der Mutationen und das Zerstören der Bindungsstellen wurde die Bildung eines stabilen Psora-4-Ionenkanal-Komplexes verhindert, der nur bei einer hohen Psora-4-Affinität für die Bindungsstelle in der zentralen Kavität und in den Seitentaschen zustande kommt.

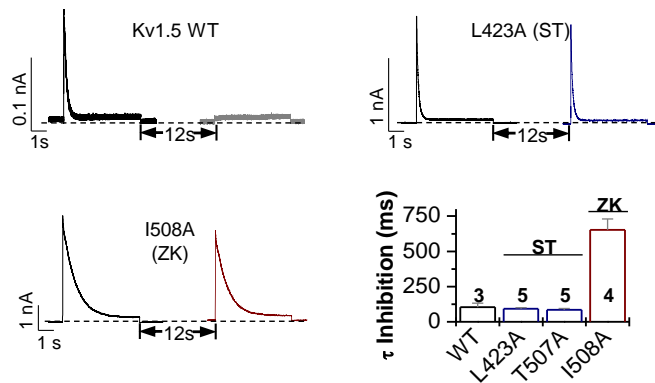


Abbildung 3.2.12-2: Der Psora-4-Inhibitionsmechanismus: Zeitverlauf und Reversibilität des Psora-4-Blocks

Psora-4-Applikation auf Kv1.5-WT-Ionenkanäle und Ionenkanalmutanten der Psora-4-Bindungsstelle (ST = Seitentaschen, blau; ZK = zentrale Kavität, rot). Nach einem Kontrollpuls (nicht dargestellt), wurde 100 nM Psora-4 für 3 Minuten appliziert. Gezeigt sind die je ersten und zweiten Pulse unter Psora-4. Die Analyse des Zeitverlaufs wurde durch eine monoexponentielle Annäherung des ersten Pulses unter Psora-4 durchgeführt (n=Zahlen an den Balken). Die Daten sind als Mittelwerte und SEM gezeigt.

Tetraethylammonium (TEA) ist ein Blocker der zentralen Pore des Ionenkanals (Armstrong & Hille, 1972). Weiterhin stabilisiert TEA den Selektivitätsfilter und verlangsamt dadurch die C-Typ-Inaktivierung (Baukrowitz & Yellen, 1996). Im nächsten Schritt wurde getestet, ob TEA die Inhibition durch Psora-4 beeinflusst. Wurde zuerst 3 mM TEA appliziert und anschließend 100 nM Psora-4, so war der Zeitverlauf der Inhibition durch Psora-4 erheblich verlangsamt (**Abb. 3.2.12-3a**). Auch verhinderte die Applikation von einer hohen TEA-Konzentration, wie 100 mM, die volle Inhibition durch Psora-4 (**Abb. 3.2.12-3b**, 2. Puls und **Abb. 3.2.12-3c**, 3. Puls). Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass TEA und Psora-4 um die Bindungsstelle in der zentralen Pore des Ionenkanals konkurrierten. Es ist auch möglich, dass durch die Stabilisierung des Selektivitätsfilters durch TEA die Bildung eines stabilen Komplexes aus inaktiviertem Kanal und Psora-4 verhindert wurde.

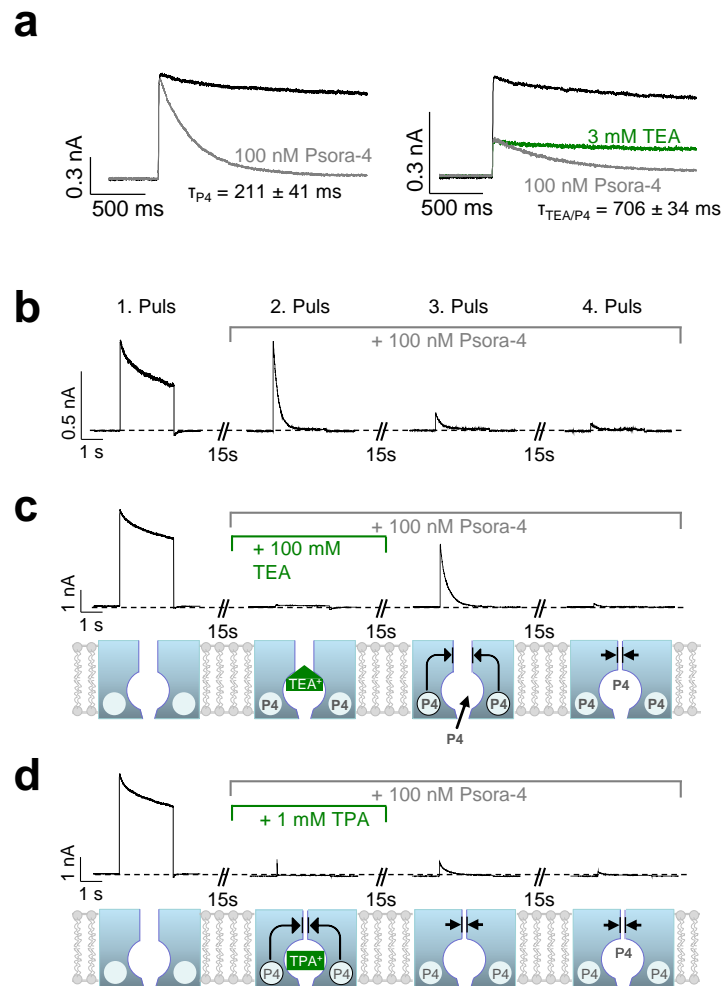


Abbildung 3.2.12-3: Der Psora-4-Inhibitionsmechanismus: Bildung eines stabilen Komplexes aus Ionenkanal und Psora-4

(a) Der Psora-4-Block mit und ohne zusätzliche Applikation von TEA. Die Daten sind als Mittelwerte und SEM gezeigt. (b-d) Applikation von (b) nur Psora-4 oder (c) Psora-4 und TEA oder (d) Psora-4 und TPA. Die Schemata im unteren Teil verdeutlichen den Vorgang der Inhibition: Das Belegen der Bindungsstellen durch Psora-4 (P4), das Konkurrieren um die Bindungsstellen, sowie den Effekt auf den Selektivitätsfilter. Die dreieckige Darstellung von TEA weist auf die Stabilisierung des Selektivitätsfilters hin. Die Pfeile zeigen den Porenkollaps an.

Um zu klären, welche dieser Alternativen vorlag, wurde das größere TPA verwendet. Dieses konkurriert ebenfalls mit anderen Porenblockern um die zentrale Bindungsstelle und kann wie TEA schnell ausgewaschen werden. Im Gegensatz zu TEA beeinflusst TPA die C-Typ-Inaktivierung nicht (Baukrowitz & Yellen, 1996). Das Experiment wurde mit 1 mM TPA unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt (**Abb. 3.2.12-3d**). Die Experimente zeigten, dass

keine Konkurrenz zwischen Psora-4 und TPA besteht. Wurde der Ionenkanal nur durch Psora-4 inhibiert (**Abb. 3.2.12-3b**) sah der dritte Puls genauso aus wie der nach Ende der Applikation von TPA (**Abb. 3.2.12-3d**, dritter Puls). Da keine Konkurrenz um die Bindungsstelle in der zentralen Pore vorlag, muss die Bindung von Psora-4 in den hydrophoben Seitentaschen einen inaktivierten Zustand des Ionenkanals induzieren, während TPA in der zentralen Pore bindet (**Abb. 3.2.12-3d**, Schema zweiter Puls). Der Komplex aus inaktiviertem Kanal und Psora-4 blieb stabil bestehen, wenn TPA aus der Pore entfernt wurde (**Abb. 3.2.12-3d**, Schema dritter Puls). Dies erklärte auch, warum die Interaktion von Psora-4 mit der Porenschleife entscheidend für die Inhibition war: Es ist anzunehmen, dass die Interaktion mit der Porenschleife den Inaktivierungs-ähnlichen Blockmechanismus am Selektivitätsfilter induziert, der als kumulative Inaktivierung bezeichnet werden kann. Demnach wäre die Interaktion mit der Porenschleife entscheidend für die Bildung des stabilen blockierten Komplexes aus Ionenkanal und Psora-4.

3.3 HUFAs blockieren offene Kv1.1-Ionenkanäle („open channel block“)

Die Interaktion zwischen hochgradig ungesättigten Fettsäuren (englisch: highly unsaturated fatty aacids, HUFAs) und Kv-Kanälen ist Gegenstand aktueller Forschung. Der zugrunde liegende Mechanismus sowie die Bindungsstelle waren bisher jedoch nicht bekannt. Am folgenden Projekt, das sich auch mit der Aufklärung des Mechanismus der Inhibition von Kv-Kanälen durch HUFAs befasst, war ich als Koautorin beteiligt (Decher et al, 2010). Daher soll diese Studie hier nur in Auszügen vorgestellt werden, um hauptsächlich das Ergebnis herauszustellen, welches ein wichtiger Ausgangspunkt für meine weitere Forschung war.

3.3.1 RNA-Editierung in der zentralen Pore des Kv1.1-Ionenkanals verhindert die Inhibition durch HUFAs

Im Kv1.1-Ionenkanal kann die Position I400 mittels RNA-Editierung durch Valin ersetzt werden (Bhalla et al, 2004) (**Abb. 3.3.1-1a**). Die Position I400 im Kv1.1-Ionenkanal ist I508 im Kv1.5-Ionenkanal homolog und gehört somit zur klassischen Medikamenten-Bindungsstelle in der zentralen Kavität. TEVC-Schlüsselexperimente zeigten, dass der durch den Kv1.1-Ionenkanal generierte Strom durch die Applikation von 10 μM Aa um 55 % inhibiert wird, jedoch I400V-Ionenkanäle überraschenderweise nicht durch 10 μM Aa blockierbar sind (**Abb. 3.3.1-1b-c**). Damit ist die Veränderung einer Aminosäure der zentralen Pore ausreichend, um die Interaktion zwischen Aa und dem Ionenkanal massiv zu stören. Aa könnte also in der zentralen Pore des Ionenkanals binden und eine Blockade des offenen Ionenkanals („open channel block“) auslösen.

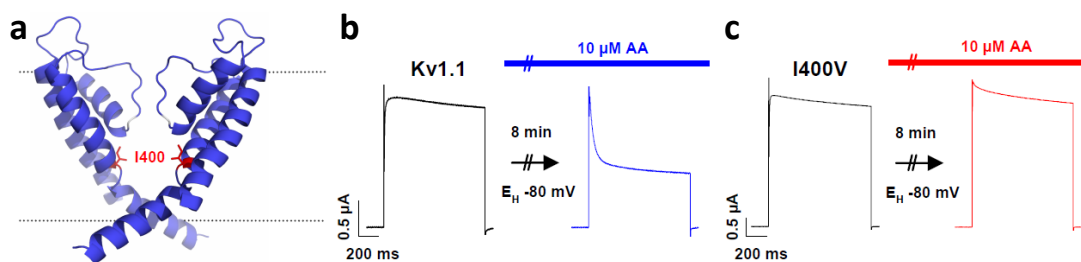


Abbildung 3.3.1-1: RNA-Editierung in der zentralen Pore verhindert die Blockade des Kv1.1-Ionenkanals durch AA

(a) Modell der Pore des Kv1.1-Ionenkanals. Es sind die porenbildenden Segmente von zwei einander gegenüberliegenden Untereinheiten gezeigt. Die gestrichelten Linien deuten die Zellmembran an. I400 ist rot hervorgehoben. (b) Effekt von 10 μM Aa (AA) auf den Kv1.1-Ionenkanal. (c) Effekt von 10 μM Aa auf den editierten I400V-Ionenkanal.

Um dies zu testen wurde unter anderem untersucht, ob TEA mit Aa um die Bindungsstelle in der zentralen Pore konkurriert (**Abb. 3.3.1-2a**). Liegt eine Kompetition zwischen TEA und einem anderen Inhibitor vor, so ist es am wahrscheinlichsten, dass dieser Inhibitor eine Blockade des offenen Ionenkanals auslöst. Die folgenden „inside-out macropatch“-Experimente wurden im Rahmen einer Kollaboration mit Prof. Baukrowitz (Institut für

Physiologie, Universität Kiel) durchgeführt. Unter Kontrollbedingungen wurden 20 μM Aa appliziert (**Abb. 3.3.1-2b**). Außerdem wurden Experimente durchgeführt, in denen zunächst 5 mM TEA appliziert wurde. Nach der Stabilisierung erfolgte dann die Applikation von 20 μM Aa (**Abb. 3.3.1-2c**). Der Zeitverlauf der Inhibition konnte mittels einer monoexponentiellen Näherung beschrieben werden. Die Zeitkonstante τ für die Inhibition durch 20 μM Aa unter Kontrollbedingungen lag bei 17 ms, während die für den Aa-Block nach einer Applikation von 5 mM TEA bei 132 ms lag (**Abb. 3.3.1-2b**). Der Zeitverlauf war also deutlich langsamer, was auf eine Konkurrenz um die Bindungsstelle in der zentralen Pore hinweist.

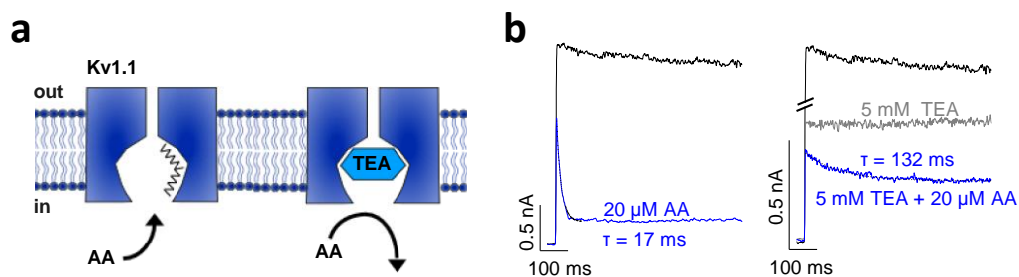


Abbildung 3.3.1-2: Konkurrenz von AA und TEA um die Bindungsstelle der zentralen Pore

(a) Das Schema verdeutlicht die Konkurrenz von Aa (AA) und TEA um die Bindungsstelle in der zentralen Pore (out: außen, extrazellulär; in: innen, intrazellulär). (b) Inhibition des Kv1.1-Ionenkanals durch 20 μM Aa (links) und durch TEA und Aa (rechts).

3.3.2 Docking von Anandamid in ein Kv1.5-Homologiemodell

Sollten HUFAs eine Blockade des offenen Ionenkanals („open channel block“) auslösen können, so müsste es möglich sein, HUFAs in ein Porenhomologiemodell des Kv1.5-Ionenkanals zu docken. Das Docking wurde in Kollaboration mit der AG Klebe im Institut für pharmazeutische Chemie an der Universität Marburg durchgeführt. Das Docking zeigte, dass die Pore groß genug ist, so dass Anandamid (grau in **Abb.3.3.2-1**) hineinpasst. Anandamid interagiert in diesem Modell mit der Aminosäure T480 in der Porensignatursequenz sowie hydrophoben Aminosäuren, die die zentrale Pore

auskleiden. Dabei führte die Bindung von Anandamid an die Bindungsstelle in der zentralen Pore zu einer Verengung der Pore, so dass die Passage von Kalium-Ionen (lila in **Abb. 3.3.2-1d**) verhindert wurde.

Der Mechanismus, der der Blockade von Kv-Kanälen durch HUFAs zu Grunde liegt, sowie die entsprechende Bindungsstelle, konnten im Rahmen dieses Projekts aufgeklärt werden: Der offene Ionenkanal wird durch die Bindung von HUFAs an die Bindungsstelle in der zentralen Ionenkanalpore blockiert, da die Passage von Kalium-Ionen verhindert wird.

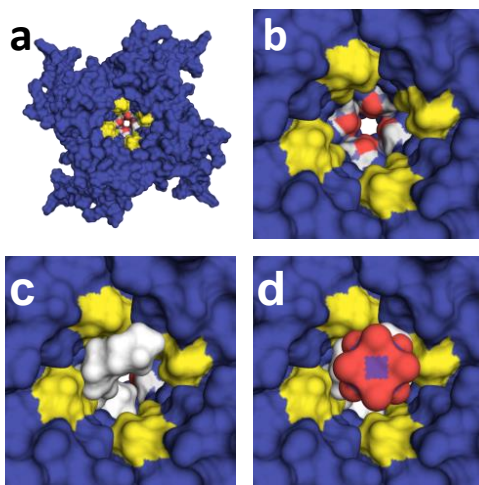


Abbildung 3.3.2-1: Docking von Anandamid in ein Kv1.5-Homologiemodell

Der offene Ionenkanal ist von der zytosolischen Seite aus gezeigt. T480 ist als Markierung für das obere Ende der Pore weiß und rot gezeigt, die PVP-Sequenz ist gelb hervorgehoben. (b) Vergrößerung von (a). (c) Docking von Anandamid (grau) in das Modell. (d) Anandamid und ein Kalium-Ion (lila) mit Hydrathülle in der zentralen Pore.

3.4 Die Interaktion von Kv-Kanälen mit Arachidonsäure

Die Studien, die bisher die Interaktion zwischen Kv-Kanälen und Arachidonsäure beschrieben, umfassten nur wenige Aminosäuren oder ausgewählte Bereiche bestimmter Domänen. Es ergibt sich ein lückenhaftes, unvollständiges Bild der Interaktion. Zwar konnte im Rahmen des oben in Auszügen dargestellten Projekts gezeigt werden, dass HUFAs in der zentralen Pore des Ionenkanals binden und eine Blockade des offenen Ionenkanals auslösen, jedoch ist bisher weder untersucht worden, ob diese auch die lateralen Fenster passieren, noch ob und wenn ja, wie HUFAs mit den Porenschleifen interagieren. Auch eine systematische Analyse der möglichen Interaktion mit dem Spannungssensor ist bisher nicht durchgeführt worden.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob auch HUFAs mit den hydrophoben Seitentaschen interagieren. Es fehlte bisher grundsätzlich eine systematische Analyse, die die Interaktion zwischen HUFAs und Kv-Kanälen detailliert betrachtet.

3.4.1 Der experimentelle Ansatz: Ein systematischer Alanin-Scan

Zur Analyse der Interaktion von Kv-Kanälen mit HUFAs wurde ein systematischer Alanin-Scan des Kv1.5-Ionenkanals mit Aa durchgeführt. Der systematische Alanin-Scan beinhaltet den S3-S4-Linker, das S4-Segment, den S4-S5-Linker, das S5-Segment, die Porenschleifen und das S6-Segment und erfasste so 132 Aminosäuren. Der Scanbereich ist in **Abb. 3.4.1-1** detailliert dargestellt.



Abbildung 3.4.1-1: Umfang des Alanin-Scans im Kv1.5-Ionenkanal

Gezeigt sind der S3-S4-Linker (rot), das S4-Segment (orange), der S4-S5-Linker (gelb), das S5-Segment (grün), die Porenschleifen (blau) und das S6-Segment (lila). Die Bereiche, die der Alanin-Scan mit 20 μ M Aa umfasst, sind farblich entsprechend hervorgehoben. (a) Von einer Untereinheit des Kv1.5-Ionenkanals ist der Bereich vom S3-S4-Linker bis zum S6-Segment gezeigt. (b) Sequenz des in (a) farblich hervorgehobenen Bereichs.

Der Effekt von 20 μ M Aa auf Kv1.5-WT-Ionenkanäle und alle funktionell exprimierenden Ionenkanalmutanten wurden mit den Spannungsprotokollen „Pharmakologie Arachidonsäure“ und „IV lang“ untersucht, die im Kapitel 2.2.7 genau beschrieben sind.

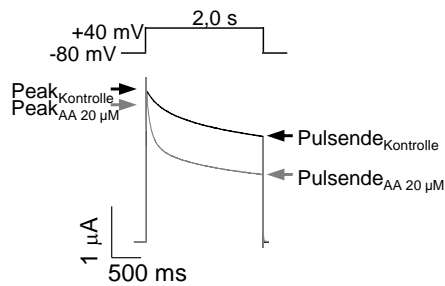


Abbildung 3.4.1-2: Analyse des Alanin-Scans

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt einer Beispielmessung des Kv1.5-Ionenkanals vor (schwarz) und nach (grau) Applikation von 20 μM Aa. Die Punkte des Stromverlaufs, die für die Auswertung verwendet wurden, sind mit Pfeilen markiert. Das Einsatzbild oben skizziert die angelegte Spannung.

Analysiert wurden drei Parameter: Die Inhibition, die Veränderung der Stromamplitude zu Beginn der Depolarisation („peak current amplitude“) und die Arachidonsäure-induzierte Inaktivierung. Zur Berechnung der Inhibition wurde die Amplitude am Pulsende vor und nach Applikation von Aa ausgewertet. Die Amplitude des Peakstroms wurde zu Beginn der Depolarisation ebenfalls vor und nach Applikation von Aa analysiert. Die Inaktivierung ist die Abnahme der Stromamplitude von Beginn der Depolarisation (Peak) bis zum Pulsende. Die Differenz der Inaktivierung nach Applikation von Aa zur Inaktivierung unter Kontrollbedingungen wurde als Aa-induzierte Inaktivierung bezeichnet. Eine Übersicht über die Auswertung findet sich in **Abb. 3.4.1-2**.

3.4.2 1. Parameter: Die Inhibition durch 20 μM Arachidosäure

Die Applikation von 20 μM Aa auf den Kv1.5-WT-Ionenkanal ergab eine Inhibition von ca. 40 % des Stroms. Diese Konzentration wurde als Scankonzentration gewählt. Eine im Vergleich zum WT signifikant ($p < 0,001$) geringere Inhibition wiesen 18 Mutanten auf (**Abb. 3.4.2-1**): K412A und L413V (S4-Segment); L420V (S4-S5-Linker); L434A, L436V, F439A, F440A und I443A (S5-Segment); N459A (Porenschleife) und I502A, V505A, I508A, L510A, V512A, P513A, V516A, F522A und Y523A (S6-Segment). Weitere vier Ionenkanalmutanten zeigten eine signifikant ($p < 0,01$) geringere Inhibition: M394A (S3-S4-Linker); Q421A und G424A (S4-S5-Linker) und D469A (Porenschleife).

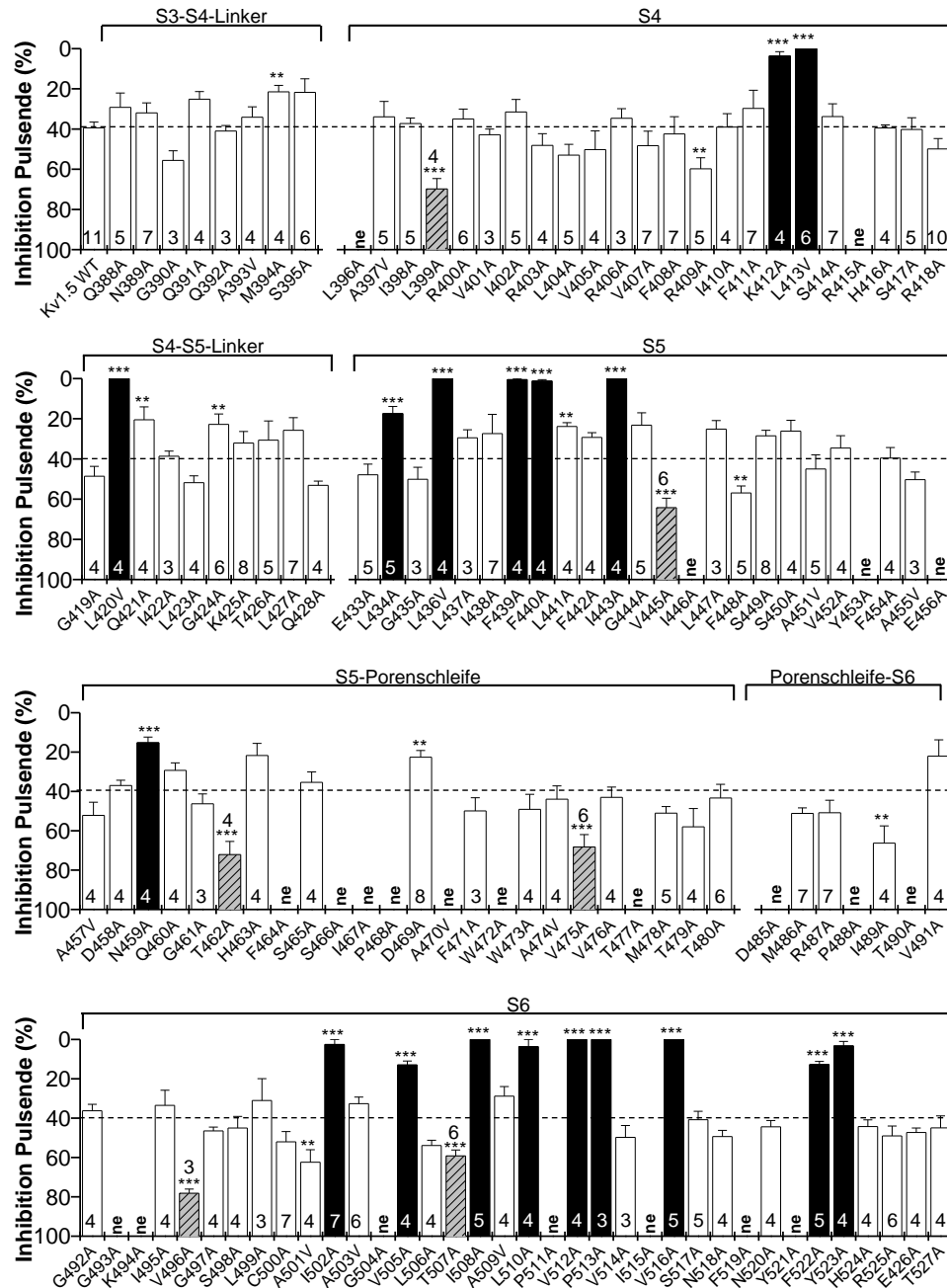


Abbildung 3.4.2-1: Analyse des 1. Parameters: Inhibition durch 20 μ M Aa

Inhibition der Ionenkanalmutanten des S3-S4-Linkers bis zum S6-Segment mit 20 μ M Aa. Signifikante ($p < 0,001$) Veränderungen werden durch gefüllte Balken hervorgehoben (schwarz: weniger Inhibition als beim WT, gestreift: mehr Inhibition als beim WT). Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Experimente an (n). Die gestrichelte Linie markiert die Inhibition des WTs. Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt ($p < 0,001$: ***, $p < 0,01$: **).

Außerdem zeigten sechs Mutanten eine im Vergleich zum WT signifikant ($p < 0,001$) stärkere Inhibition durch Applikation von 20 μ M Aa: L399A (S4-

Segment); V445A (S5-Segment); T462A und V475A (Porenschleifen) und V496A und T507A (S6-Segment). Für drei weitere Ionenkanalmutanten ergab die Analyse eine signifikant ($p < 0,01$) stärkere Inhibition: R409A (S4-Segment); F448A (S5-Segment) und I489A (Porenschleifen) (**Abb. 3.4.2-1**).

Repräsentative TEVC-Messungen des Kv1.5-WT-Ionenkanals und einer Ionenkanalmutante, auf die Aa einen WT-ähnlichen Effekt hatte, sind in **Abb. 3.4.2-2a** gezeigt. Beispiele für Ionenkanalmutanten, die weniger (z.B. L436V, F440A und I502A) oder stärker als der WT inhibiert wurden (z.B. V445A und L399A) sind in **Abb. 3.4.2-2b** dargestellt.

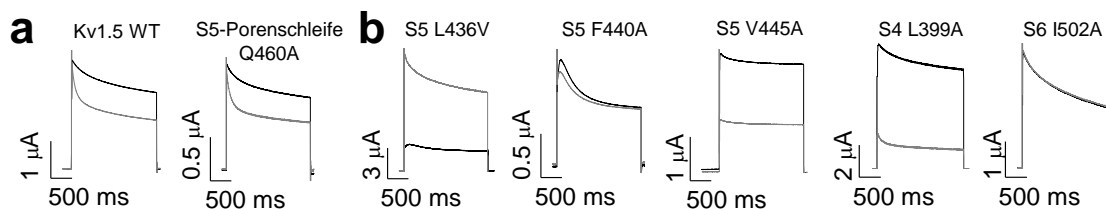


Abbildung 3.4.2-2: Repräsentative Beispiele der Inhibition durch 20 μ M Aa

(a) Repräsentative Beispielmessungen des Kv1.5-WT-Ionenkanals sowie Ionenkanalmutanten, die WT-ähnlich blockiert wurden, vor (schwarz) und nach (grau) Applikation von 20 μ M Aa. (b) Repräsentative Beispielmessungen von Ionenkanalmutanten mit im Vergleich zum WT signifikant veränderter Inhibition durch Aa vor (schwarz) und nach Applikation von 20 μ M Aa (grau).

Die Effekte von Aa auf diese Ionenkanalmutanten waren jedoch sehr unterschiedlich: So wurden V445A und L399A deutlich stärker als der WT inhibiert. Jedoch schien Aa kaum Inaktivierung zu induzieren. Für L436V war eine enorme Erhöhung der Stromamplitude zu Beginn der Depolarisation, des Peakstroms, und Aa-induzierte Inaktivierung zu beobachten, während bei I502A und F440A durch Aa keine Inhibition und keine zusätzliche Inaktivierung induziert wurde. Daher sollten die Veränderung des Peakstroms und die Aa-induzierte Inaktivierung ebenfalls analysiert werden, um die Aa-Effekte besser beschreiben zu können.

3.4.3 2. Parameter: Die Veränderung des Peakstroms durch 20 μM Aa

Die Analyse der Veränderung des Peakstroms des Kv1.5-WT-Ionenkanals durch Applikation von 20 μM Aa ergab eine Verringerung um 14 % (**Abb. 3.4.3-1**). Eine signifikant ($p < 0,001$) schwächere Verringerung im Vergleich zum WT oder sogar eine Erhöhung des Peakstroms konnte für 20 Ionenkanalmutanten festgestellt werden (**Abb. 3.4.3-1**): I410A, K412A, L413V und H416A (S4-Segment); L420V und T426A (S4-S5-Linker); L436V, I438A, F439A, L441A, I443A, G444A und L447A (S5-Segment) und I502A, A503V, I508A, V512A, V516A, F522A und Y523A (S6-Segment). Weitere acht Ionenkanalmutanten wiesen im Vergleich zum WT eine signifikant ($p < 0,01$) schwächere Verringerung des Peakstroms auf: Q391A und M394A (S3-S4-Linker); F411A (S4); Q421A und Q428A (S4-S5-Linker); V491A (Porenschleifen) und A509V und L510A (S6-Segment). Für 13 Ionenkanalmutanten konnte eine signifikant ($p < 0,001$) verstärkte Verringerung des Peakstroms im Vergleich zum Kv1.5-WT-Ionenkanal festgestellt werden (**Abb. 3.4.3-1**): L399A, L404A und R409A (S4-Segment); V445A und F448A (S5-Segment); T462A, V475A und M478A (Porenschleife) und V496A, G497A, A501V, L506A und V514A (S6-Segment). Zwei weitere Ionenkanalmutanten zeigten eine signifikant ($p < 0,01$) stärkere Verringerung: A474V und R487A (Porenschleifen).

Durch Applikation von Aa wird die Spannungsabhängigkeit des Ionenkanals verändert. Der $V_{1/2}$ -Wert gibt die Spannung über der Membran an, bei der die Hälfte der Ionenkanäle aktiviert ist. Durch das Einfügen von Mutationen in einen Ionenkanal kann die Spannungsabhängigkeit und damit der $V_{1/2}$ -Wert verändert werden. Es war also möglich, dass Ionenkanalmutanten einen $V_{1/2}$ -Wert aufweisen, der so weit in positiver Richtung verschoben ist, dass auch bei Applikation des Testpulses zu +40 mV noch ein Großteil der Ionenkanäle geschlossen ist. Da Aa die Spannungsabhängigkeit in negativer Richtung verschiebt, hätte Aa so die Ionenkanäle scheinbar aktivieren können.

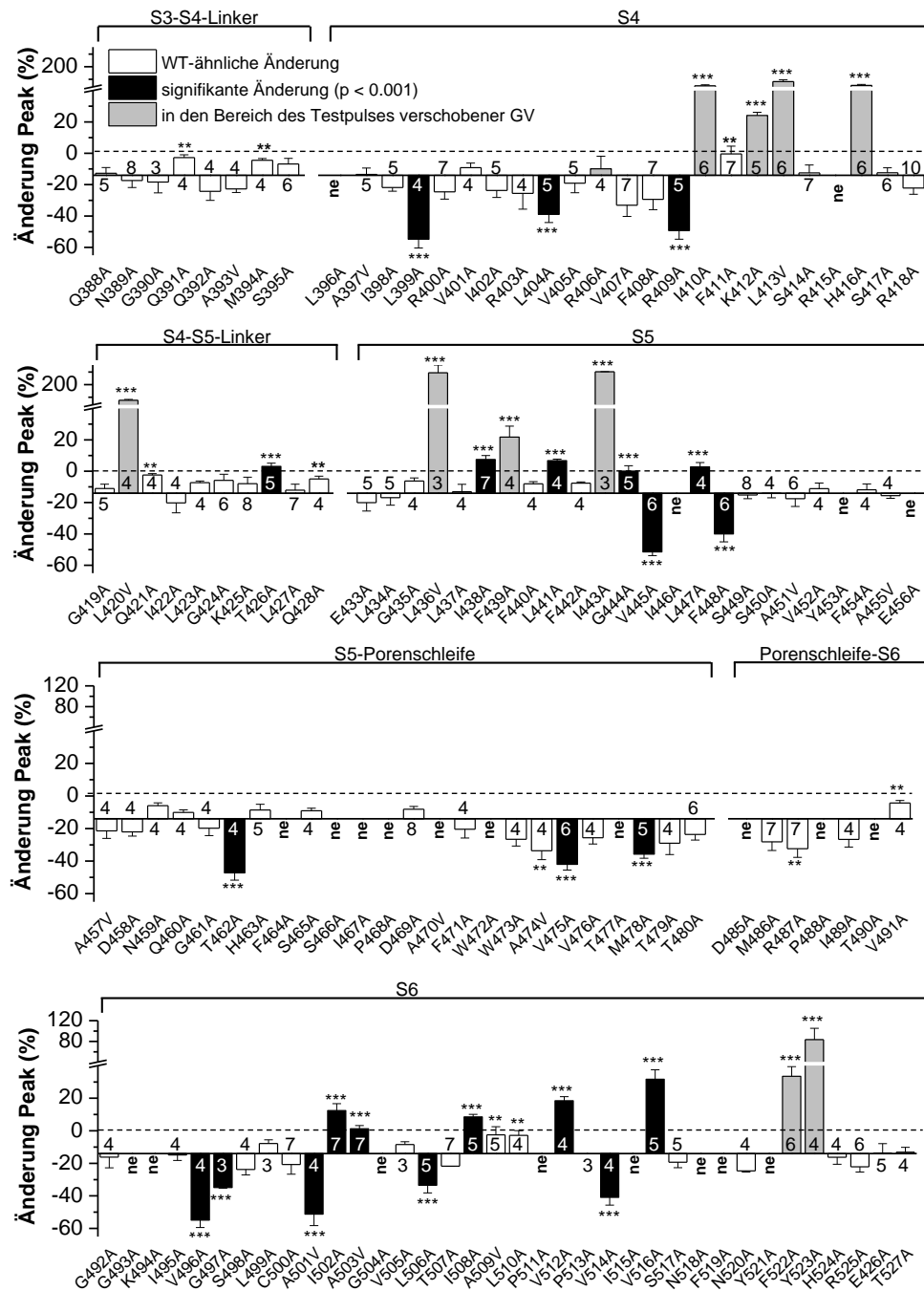


Abbildung 3.4.3-1: Analyse des 2. Parameters: Veränderung des Peakstroms durch Applikation von 20 μ M Aa

Änderung des Peakstroms der Ionenkanalmutanten des S3-S4-Linkers bis zum S6-Segment mit 20 μ M Aa. Signifikante ($p < 0,001$) Veränderungen werden durch schwarz gefüllte Balken hervorgehoben. Graue Balken zeigen Ionenkanalmutanten mit stark positiv verschobenem $V_{1/2}$ -Wert an. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Experimente an (n). Die x-Achse liegt auf dem gemessenen Wert der Veränderung des Peakstroms des Kv1.5-WTs. Die gestrichelte Linie markiert einen x-Wert von 0 %, also keine Veränderung des Peakstroms durch Applikation von Aa. Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt ($p < 0,001$: ***, $p < 0,01$: **).

Die Veränderung des Peakstroms wurde daher gegen die $V_{1/2}$ -Werte des Kv1.5-WT-Ionenkanals und der Ionenkanalmutanten aufgetragen (**Abb. 3.4.3-2**). Elf Ionenkanalmutanten wiesen einen stark positiv, in den Bereich des Testpulses verschobenen $V_{1/2}$ -Wert auf: R406A, I410A, K412A, L413V und H416A (S4-Segment); L420V (S4-S5-Linker); L436V, F439A und I443 (S5-Segment) und F522A und Y523A (S6-Segment). Diese wurden in **Abb. 3.4.3-1** grau gekennzeichnet.

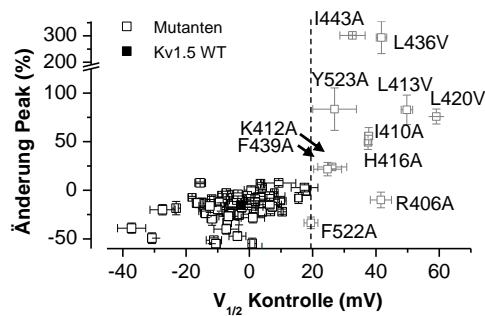


Abbildung 3.4.3-2: Die Veränderung des Peakstroms aufgetragen gegen die $V_{1/2}$ -Werte der Ionenkanalmutanten

Mutanten mit stark positiv verschobenem $V_{1/2}$ -Wert sind durch eine gestrichelte Linie abgeteilt, grau gezeigt und zusätzlich beschriftet. Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt.

Repräsentative Beispiele für die TEVC-Messungen einiger Ionenkanalmutanten sind in **Abb. 3.4.3-3** gezeigt. Zwei der dargestellten Beispiele wiesen im Vergleich zum WT eine stärkere Verringerung des Peakstroms auf: (T462A und F448A). Im Gegensatz dazu hatte beispielsweise die Ionenkanalmutanten I443A, H416A und L420V einen stark rechts verschobenen $V_{1/2}$ -Wert. Es war deutlich zu sehen, dass Aa sie scheinbar aktivierte, so dass keine Inhibition am Pulsende gemessen werden konnte und der Peakstrom stark erhöht war. Gleichzeitig wurde offensichtlich durch die Applikation von Aa Inaktivierung induziert. Diese Ionenkanalmutanten waren also, obwohl keine Inhibition gemessen wurde, nicht resistent gegen Aa. Der Peakstrom der Ionenkanalmutanten, die resistent gegen Aa sind, sollte sich bei Applikation von Aa nicht verändern. Dies ist im Vergleich zum Kv1.5-WT-Ionenkanal eine schwächere Verringerung des Peakstroms und somit in der oben gezeigten

Abb. 3.4.3-1 ein positiver Ausschlag bis zur gestrichelten Linie (die „0“-Linie, die anzeigt, dass Aa keinen Effekt auf den Peakstrom hatte).

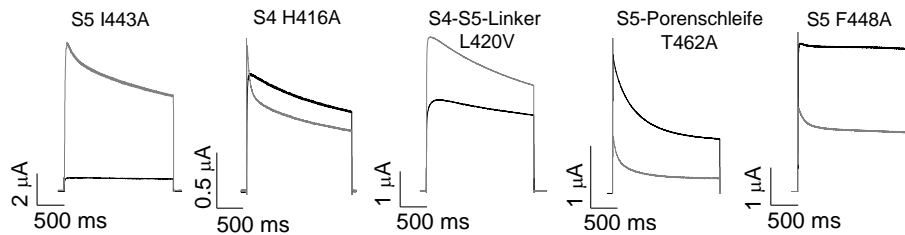


Abbildung 3.4.3-3: Repräsentative Beispielmessungen von Ionenkanalmutanten mit verändertem Aa-Effekt auf den Peakstrom

Repräsentative Messungen von Ionenkanalmutanten mit im Vergleich zum WT signifikant veränderter Änderung des Peakstroms vor (schwarz) und nach Applikation von 20 μM Aa (grau).

3.4.4 3. Parameter: Die Aa-induzierte Inaktivierung

Die Applikation von Aa führte zu einer Inaktivierungs-ähnlichen Inhibition. Es sollte auch dieser Parameter bestimmt werden (**Abb. 3.4.4-1**), da die Analyse der Inhibition und der Veränderung des Peakstroms nicht ausreichten, um die beobachteten Aa-Effekte zu beschreiben. 20 μM Aa induzierten 21 % Inaktivierung im Kv1.5-WT-Ionenkanal. Eine im Vergleich zum WT signifikante ($p < 0,01$) Steigerung der Aa-induzierten Inaktivierung wiesen zwei Ionenkanalmutanten auf (**Abb. 3.4.4-1**): I410A (S4-Segment) und T507A (S6-Segment). Acht Ionenkanalmutanten wiesen eine im Vergleich zum WT signifikante ($p < 0,001$) Verringerung der Aa-induzierten Inaktivierung auf: R400A und R409A (S4-Segment); L434A und F440A (S5-Segment) und I502A, V505A, I508A und V516A (S6-Segment). Für weitere neun Ionenkanalmutanten konnte eine signifikante ($p < 0,01$) Verringerung der Aa-induzierten Inaktivierung festgestellt werden: I402A (S4-Segment); L437A und S449A (S5-Segment); N459A, H463A, M478A, T479A und T480A (Porenschleifen) und L510A (S6-Segment).

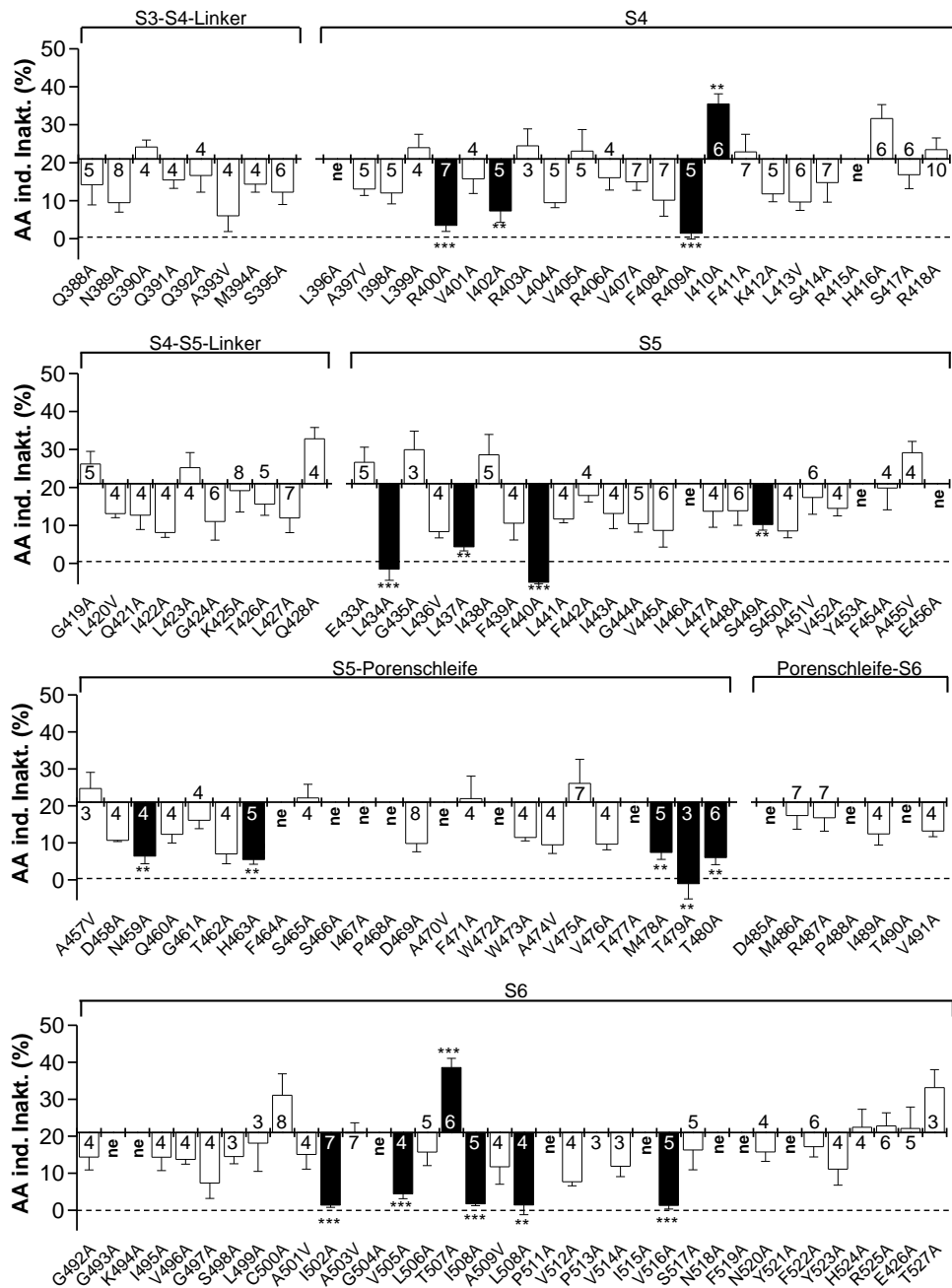


Abbildung 3.4.4-1: Analyse des 3. Parameters: Aa-induzierte Inaktivierung

Induzierte Inaktivierung bei Applikation von 20 μ M Aa der Ionenkanalmutanten des S3-S4-Linkers bis zum S6-Segment. Schwarz gefüllte Balken kennzeichnen signifikante Veränderungen. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Experimente an (n). Die x-Achse liegt auf dem gemessenen Wert der Aa-induzierten Inaktivierung des Kv1.5-WTs. Die gestrichelte Linie markiert einen x-Wert, also eine Aa-induzierte Inaktivierung, von 0 %. Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt ($p < 0,001$: ***, $p < 0,01$: **).

Um auszuschließen, dass ein durch Einfügen der Mutation verschobener $V_{1/2}$ -Wert die gemessene Aa-induzierte Inaktivierung verfälscht, wurde die Aa-induzierte Inaktivierung gegen die $V_{1/2}$ -Werte unter Kontrollbedingungen aufgetragen (**Abb. 3.4.4-2**). Es besteht keine Korrelation zwischen diesen Werten.

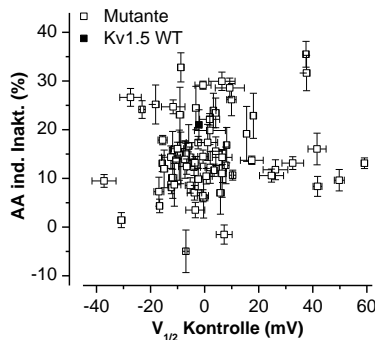


Abbildung 3.4.4-2: Keine Korrelation der Aa-induzierten Inaktivierung mit den $V_{1/2}$ -Werten der Ionenkanalmutanten

Die Aa-induzierte Inaktivierung aufgetragen gegen die $V_{1/2}$ -Werte der Ionenkanalmutanten. Die Werte sind als Mittelwert und SEM gezeigt.

Repräsentative Beispiele der durchgeführten Messungen sind in **Abb. 3.4.4-3** gezeigt. Die Ionenkanalmutanten T507A und I410A sind als Beispiele für eine, im Vergleich zum Kv1.5-WT-Ionenkanal, verstärkte Aa-induzierte Inaktivierung gezeigt. Die Ionenkanalmutanten R409A, H463A und L434A zeigen in unterschiedlichem Maß eine verringerte Aa-induzierte Inaktivierung im Vergleich zum WT.

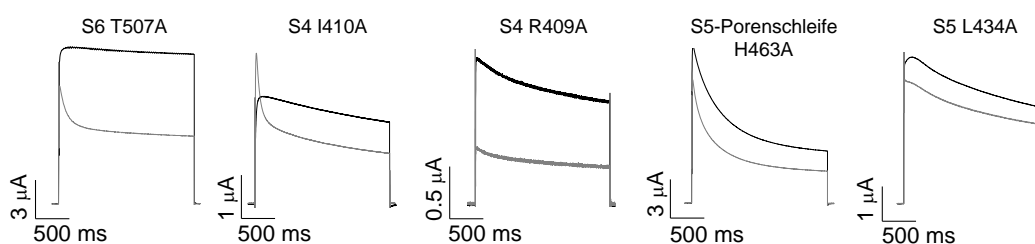


Abbildung 3.4.4-3: Beispiele von TEVC-Messungen von Ionenkanalmutanten mit veränderter Aa-induzierter Inaktivierung

Repräsentative Messungen von Ionenkanalmutanten mit signifikant veränderter Aa-induzierter Inaktivierung im Vergleich zum WT vor (schwarz) und nach Applikation von 20 μ M Aa (grau).

3.4.5 Die Zusammenfassung der Ergebnisse des systematischen Alanin-Scans

In den folgenden Abbildungen sind die gescannten Bereiche des Ionenkanals der Übersicht wegen unterteilt. Zur zentralen Kavität wurden die Aminosäuren gerechnet, die das Innere der Kavität auskleiden. Somit gehörten auch die Aminosäuren T479A und T480A dazu, die im unteren Bereich der Porensignatursequenz lokalisiert sind und den oberen Teil der zentralen Pore bilden (**Abb. 3.4.5-1**). Die Bereiche, die sich auf der extrazellulären Seite des Ionenkanals befinden sowie die Porenschleifen wurden hier als „Extrazelluläre Bereiche“ zusammengefasst (**Abb. 3.4.5-2**). Die hydrophoben Seitentaschen (**Abb. 3.4.5-3**) bestehen aus den der zentralen Pore abgewandten „Rückseiten“ der S5- und S6-Segmente, dem S4-S5-Linker und auch dem S4-Segment. Um die Übersicht zu gewährleisten, wurde hier das S4-Segment separat von den anderen Bereichen der hydrophoben Seitentaschen dargestellt. Es ist auch sinnvoll, das S4-Segment und den S3-S4-Linker, die als Bestandteile der spannungswahnehmenden Segmente eine eigene Funktion haben, gemeinsam zu zeigen (**Abb. 3.4.5-4**).

Die genauere Betrachtung der zentralen Kavität bestätigte, dass Mutationen der Aminosäuren, die die Pore auskleiden und zur klassischen Medikamenten-Bindungsstelle gehören, an der Interaktion mit Aa beteiligt sind (**Abb. 3.4.5-1a und b**). So war die Aa-induzierte Inaktivierung für die Ionenkanalmutanten T479A und T480A verringert. V505A, I508A und V516A waren resistent gegenüber Aa. Sie wurden weder inhibiert, noch wurde durch Aa eine Inaktivierung induziert.

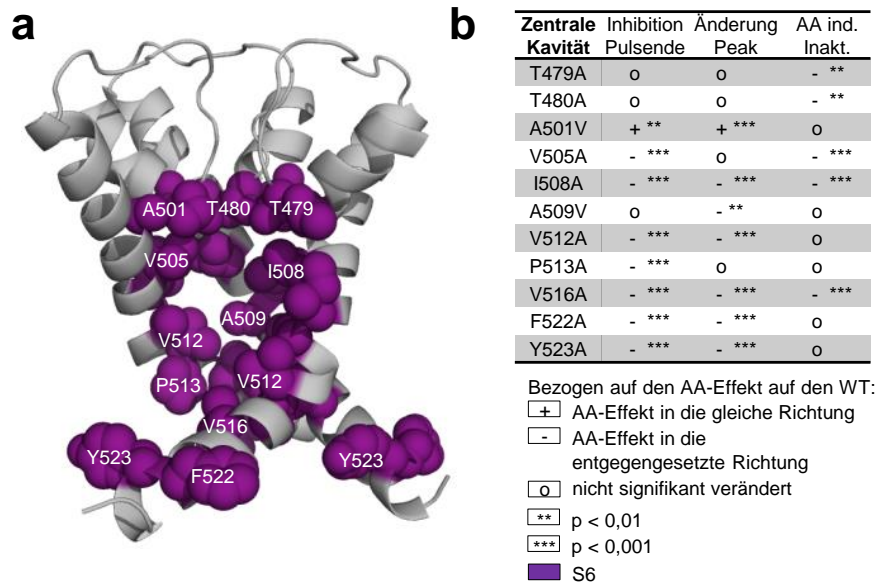


Abbildung 3.4.5-1: Übersicht der signifikant veränderten Aa-Effekte auf Ionenkanalmutanten der zentralen Kavität

Dargestellt sind (a) die Lokalisation und (b) die Änderung der Aa-Effekte auf die im Scan identifizierte Ionenkanalmutanten der zentralen Pore. Die Reste der im Scan identifizierten Aminosäuren sind lila hervorgehoben. Gezeigt sind die S6-Segmente und Porenschleifen von drei Kv1.5-Untereinheiten.

Die Analyse Interaktion von Aa mit den Ionenkanalmutanten der extrazellulären Bereiche zeigte, dass der Peakstrom durch Aa häufig stärker verringert wurde (**Abb. 3.4.5-2a und b**). Der Aa-Effekt auf den Kv1.5-Ionenkanal gliederte sich in zwei Abschnitte: Zunächst kam es schnell zu einer scheinbaren „Aktivierung“. Der Peakstrom wurde größer und gleichzeitig wurde ein Inaktivierungs-ähnlicher Verlauf induziert. Erst etwas später begann dann die eigentliche Inhibition, also die Verringerung der gesamten Stromamplitude. Da beide Teile des Effektes teilweise gleichzeitig abliefen, kann die zu Beginn der Applikation beobachtete „Aktivierung“ kaum genau beschrieben werden, da die einsetzende Inhibition dieser entgegenläuft. Mutationen in den extrazellulären Bereichen verhindern vermutlich vor allem den ersten, schnellen Teil des Effekts, die scheinbare „Aktivierung“ des Ionenkanals. Daher führte eine Mutation in diesem Bereich zu einer stärkeren Verringerung des Peakstroms und teilweise auch zu einer stärkeren Inhibition.

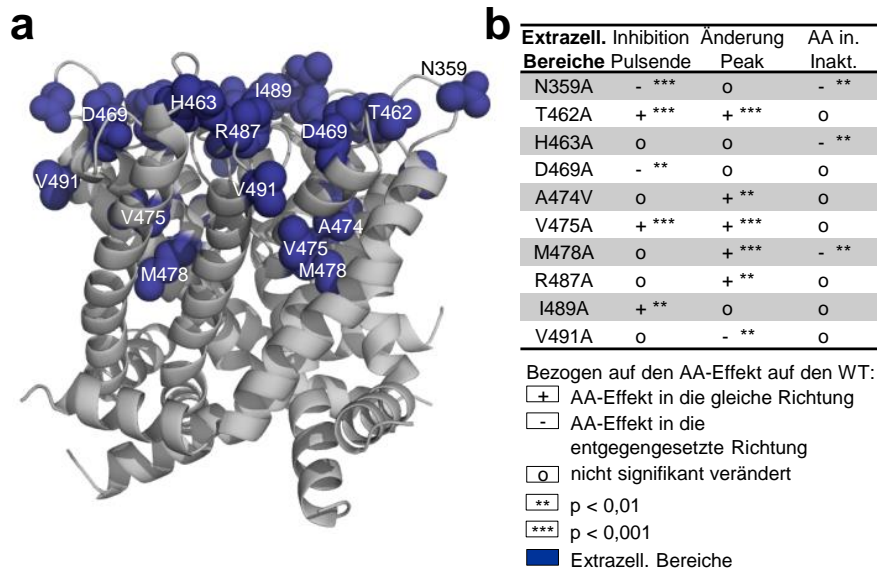


Abbildung 3.4.5-2: Übersicht der signifikant veränderten Aa-Effekte auf Ionenkanalmutanten der extrazellulären Bereiche

Dargestellt sind (a) die Lokalisation und (b) die Änderung der Aa-Effekte auf die im Scan identifizierte Ionenkanalmutanten der extrazellulären Bereiche. Die Reste der im Scan identifizierten Aminosäuren sind dunkelblau hervorgehoben. Dargestellt sind S4-S5-Linker bis S6-Segment von allen vier Untereinheiten des Kv1.5-Ionenkanals und die Übersicht über die Veränderung der Aa-Effekte.

Die Analyse der hydrophoben Seitentaschen ergab, dass die Aminosäuren, deren Reste diese Taschen auskleiden, für die Interaktion mit Aa von Bedeutung sind (**Abb. 3.4.5-3a und b**). Wie zu erwarten war, waren dabei viele Aminosäuren beteiligt, die zur Psora-4-Bindungsstelle im Kv1.5-Ionenkanal gehören. Die Psora-4-Bindungsstelle und die Aminosäuren, die wichtig für die Interaktion mit Aa sind, waren jedoch nicht identisch. Auffällig war, dass zusätzlich zur zentralen Kavität auch in den hydrophoben Seitentaschen Aa-resistente Ionenkanalmutanten vorlagen: L434A, F440A, T507A und L510A, wobei die drei letztgenannten auch zur Psora-4-Bindungsstelle gehören. Die Mutation der Aminosäure I502A, deren Rest in die lateralen Fenster gerichtet ist, gehörte ebenso zu den Aa-resistenten Ionenkanalmutanten.

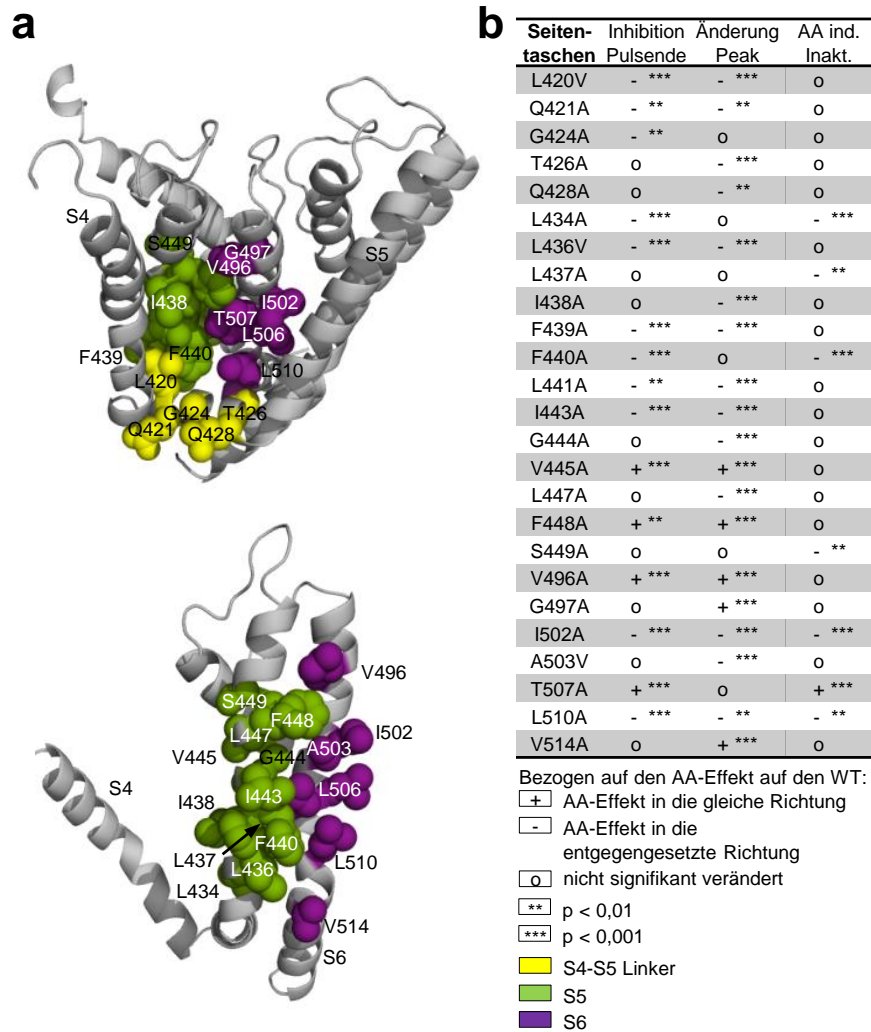


Abbildung 3.4.5-3: Übersicht der signifikant veränderten Aa-Effekte auf Ionenkanalmutanten der hydrophoben Seitentaschen

Dargestellt sind (a) die Position und (b) die Übersicht über die Änderung der Aa-Effekte auf die im Scan identifizierte Ionenkanalmutanten der hydrophoben Seitentaschen. (a) Die Reste der im Scan identifizierten Aminosäuren sind farblich entsprechend der Legende hervorgehoben. Der Übersicht wegen sind Aminosäuren des S4-Segments (oben) bzw. des S4-S5-Linkers und des S4-Segments (unten) nicht hervorgehoben. Dargestellt ist je der Bereich vom S4- bis zum S6-Segment einer Untereinheit des Kv1.5-Ionenkanals.

Die Betrachtung der spannungswahrnehmenden Segmente zeigte, dass auch die Aminosäuren I410, K412, L413 und H416, die zur Psora-4-Bindungsstelle gehören, an der Interaktion mit Aa beteiligt sind (**Abb. 3.4.5-4a und b**). Die Ionenkanalmutanten des unteren Bereichs des S4-Segments wiesen vor allem eine schwächere Verringerung des Peakstroms auf. Interessanterweise waren

auch die positiv geladenen Aminosäuren des Spannungssensors R400 (R1), R409 (R4) und K412 (K5) für die Interaktion mit Aa von Bedeutung.

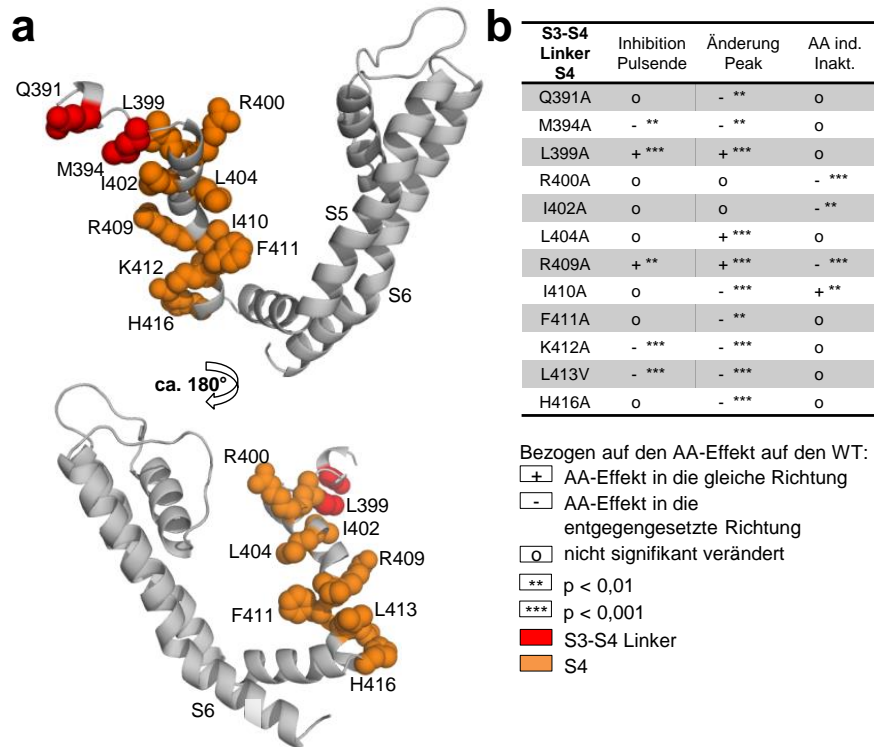


Abbildung 3.4.5-4: Übersicht der signifikant veränderten Aa-Effekte auf Ionenkanalmutanten des S4-Segments und des S3-S4-Linkers

Dargestellt sind (a) die Position und (b) die Übersicht über die Änderung der Aa-Effekte auf die im Scan identifizierten Ionenkanalmutanten des S4-Segments und des S3-S4-Linkers (a) Die Reste der im Scan identifizierten Aminosäuren sind farblich hervorgehoben, wie in der Legende erläutert. Dargestellt ist der Bereich vom S3-S4-Linker bis zum S6-Segment einer Untereinheit des Kv1.5-Ionenkanals.

Eine zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse des systematischen Alanin-Scans ergab, dass die Aminosäuren, deren Substitution zu einer schwächeren Verringerung des Peakstroms führte, sich eher im unteren, inneren Bereich des Ionenkanals befanden, während die Aminosäuren, deren Substitution zu einer stärkeren Verringerung des Peakstroms führte, eher im oberen, äußeren Bereich des Ionenkanals lokalisiert waren (**Abb. 3.4.5-5**). Dies deutete, wie die oben gezeigte Analyse der extrazellulären Bereiche, darauf hin,

dass die äußeren Bereiche für die schnelle scheinbare Aktivierung zu Beginn des Aa-Effekts verantwortlich sind.

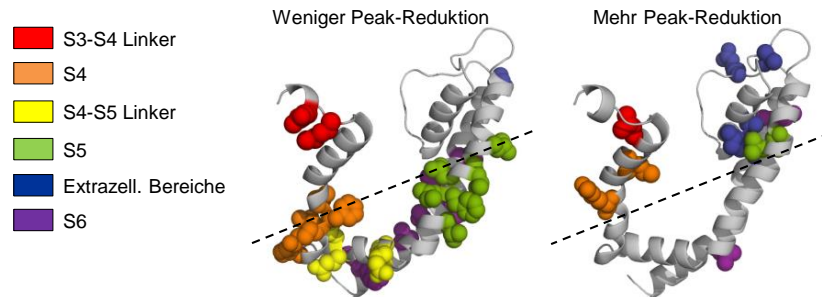


Abbildung 3.4.5-5: Position der Aminosäuren, deren Mutation zu einer Veränderung des Aa-Effekts auf den Peakstrom führte

Gezeigt ist der Bereich vom S3-S4-Linker bis zum S6-Segment einer Kv1.5-Untereinheit. Hervorgehoben nach dem links gezeigten Farbschema sind die Reste der Aminosäuren, deren zugehörige Ionenkanalmutante im Scan eine schwächere (Mitte) oder verstärkte (rechts) Verringerung des Peakstroms aufwies.

Die Reste der Aa-resistenten Ionenkanalmutanten kleiden entweder die zentralen Pore des Ionenkanals (V505, I508 und V516) oder die hydrophoben Seitentaschen (L434, F440 und L510) aus (**Abb. 3.4.5-6a**). Weiterhin war die Ionenkanalmutante I502A resistent gegen Aa (**Abb. 3.4.5-6a**). I502 zeigt in die lateralen Fenster, die die zentrale Pore und die hydrophoben Seitentaschen verbinden. Interessant war auch, dass auch die Substitution von N459, einer Aminosäure des extrazellulären Bereichs, zur Aa-Resistenz führte (**Abb. 3.4.5-6a**).

Außerdem fiel eine Gruppe von Aminosäuren auf, deren Substitution zu einer stärkeren Verringerung des Peakstroms und zu mehr Inhibition oder weniger Aa-induzierter Inaktivierung führten (**Abb. 3.4.5-6b**): L399 und R409 (S4-Segment); V445 und F448 (S5-Segment); T462 und V475 (Porenschleife) und V496 und A501 (S6-Segment). Alle Mutanten dieser Gruppe befanden sich tendenziell im oberen, äußeren Bereich des Ionenkanals.

Zwei Mutationen, I410A (S4-Segment) und T507A (S6-Segment) zeigten einen auffälligen, verstärkten Aa-Effekt (**Abb. 3.4.5-6c**): Aa induzierte nur bei diesen beiden Ionenkanalmutanten mehr Inaktivierung. Daher wurden I410A und T507A als „gain-of-function“-Gruppe bezeichnet.

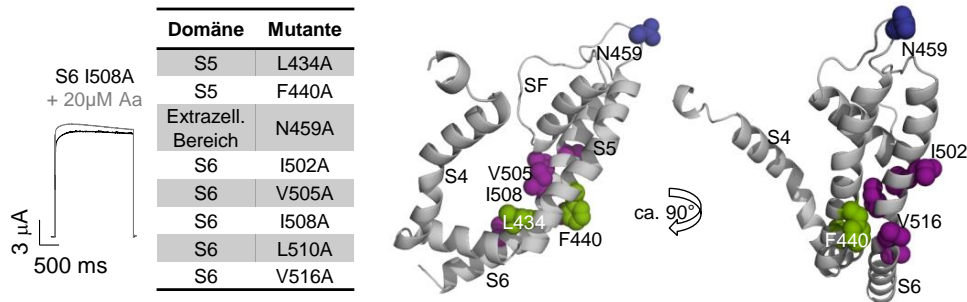
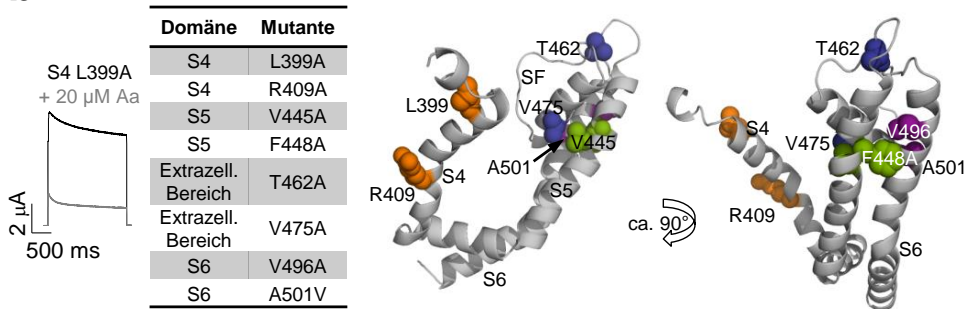
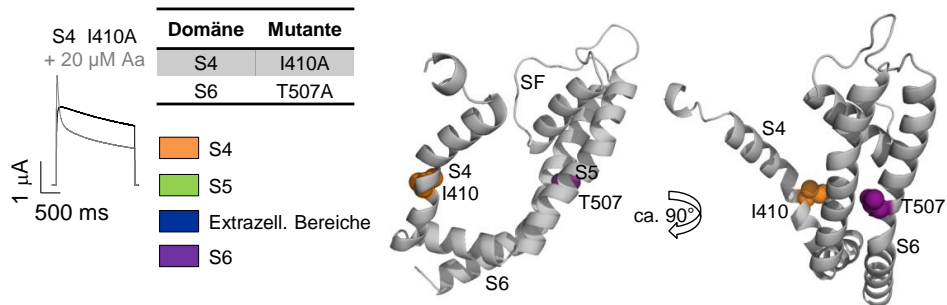
a AA-resistent: Weniger induzierte Inaktivierung und weniger Inhibition**b** Mehr Peak-Reduktion und mehr Block oder weniger induzierte Inaktivierung**c** Gain-of-function: Mehr induzierte Inaktivierung und mehr Inhibition oder Peak-Erhöhung

Abbildung 3.4.5-6: Übersicht über weitere Ergebnisse und Gruppen von Ionenkanalmutanten mit signifikanten Änderungen mehrerer Parameter

(a-c) Dargestellt sind jeweils Gruppen von Ionenkanalmutanten, die signifikante Veränderungen in mehreren der analysierten Parametern des Aa-Effekts aufweisen. Links ist je ein repräsentatives Beispiel gezeigt, mittig eine Übersicht und rechts die Position der identifizierten Aminosäuren im Ionenkanal. Gezeigt ist jeweils der Bereich vom S3-S4-Linker bis zum S6-Segment einer Kv1.5-Untereinheit. Die in (c) dargestellte Farbkodierung gilt für die gesamte Abbildung.

3.4.6 Aa gleicht durch Mutation verschobene $V_{1/2}$ -Werte aus

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung von Aa auf die $V_{1/2}$ -Werte der Ionenkanalmutanten untersucht. Hierzu wurden die $V_{1/2}$ -Werte unter

Kontrollbedingungen für den Kv1.5-WT-Ionenkanal und die Ionenkanalmutanten, die den Spannungssensor S4 oder die beiden umliegenden Linker betreffen, und die Verschiebung des $V_{1/2}$ -Werts durch Applikation von Aa bestimmt (**Abb. 3.4.6-1a und b**).

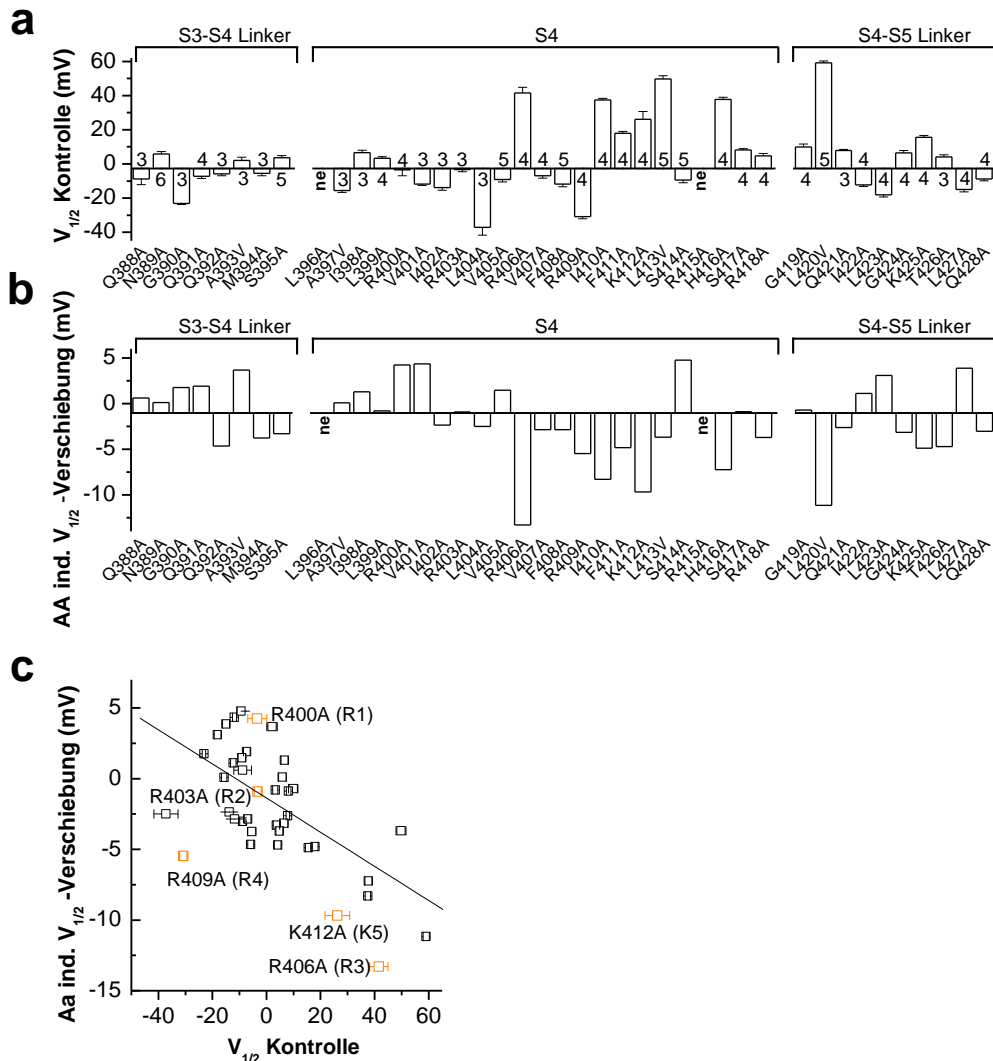


Abbildung 3.4.6-1: Zusammenhang des $V_{1/2}$ -Werts der Ionenkanalmutanten und der Verschiebung des $V_{1/2}$ -Werts durch Applikation von 20 μ M Aa

(a) $V_{1/2}$ -Werte der Ionenkanalmutanten des S3-S4-Linkers, des S4-Segments und des S4-S5-Linkers. (b) Verschiebung der $V_{1/2}$ -Werte bei Applikation von 20 μ M Aa. (c) Aufgetragen sind die $V_{1/2}$ -Werte der Ionenkanalmutanten und die Verschiebung durch Aa. Die positiv geladenen Aminosäuren im Spannungssensor sind orange hervorgehoben.

Das Auftragen beider Werte gegeneinander zeigte, dass Aa den $V_{1/2}$ -Wert von Ionenkanalmutanten mit positiv verschobenem Kontroll- $V_{1/2}$ -Wert in negative Richtung verschob und den von Ionenkanalmutanten mit negativ verschobenem Kontroll- $V_{1/2}$ -Wert in positive Richtung verschob (**Abb. 3.4.6-1c**). Aa glich also die durch Mutation verschobenen Kontroll- $V_{1/2}$ -Werte tendenziell aus.

4 Diskussion

4.1 Die Bindungsstelle und der Inhibitionsmechanismus von Psora-4

4.1.1 Psora-4 bindet in der zentralen Pore und in den hydrophoben Seitentaschen

Kv-Ionenkanäle sind wichtige Zielmoleküle bei der Behandlung verschiedenster kardialer, neurodegenerativer und neuroinflammatorischer Erkrankungen. Durch die hohe Konservierung der klassischen Medikamenten-Bindungsstelle in der zentralen Pore schien es unmöglich, bestimmte Kv-Ionenkanäle selektiv zu inhibieren. Psora-4 blockiert jedoch selektiv Kv1-Kanäle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese Selektivität dadurch zustande kommt, dass ein Psora-4-Molekül in der zentralen Pore des Ionenkanals bindet, während vier weitere mit den weniger konservierten hydrophoben Seitentaschen interagieren. Dieses Ergebnis wird durch folgende Punkte bestätigt: (1) Ein systematischer Alanin-Scan des S4-Segments, des S4-S5-Linkers, des S5-Segments, der Porenschleifen und des S6-Segments zeigt, dass alle Segmente, die die hydrophoben Seitentaschen oder die zentrale Kavität auskleiden, für die Interaktion mit Psora-4 von entscheidender Bedeutung sind. Eine einzige Mutation in der Bindungsstelle in einer von diesen Domänen führt zu einem Verlust der Psora-4-Affinität. (2) Die als Bindungsstelle identifizierten Aminosäuren sind in einem „helikalen Muster“ angeordnet, das heißt, sie befinden sich auf der gleichen Seite der Helix und zeigen in die hydrophoben Seitentaschen oder in die zentrale Kavität hinein. (3) Das Einbringen von Kv1-Seitentaschen macht Kv2-Ionenkanäle Psora-4-sensitiv. (4) Die Ergebnisse der TEVC-Experimente werden sowohl durch computergestützte Liganden-Dockings als auch von den MDss bestätigt. (5) Der hohe Hill-Koeffizient der Konzentrations-Wirkungskurve von Psora-4 an den Kv1.5-Ionenkanal weist auf eine hohe Kooperativität hin und damit auf eine gleichzeitige, sich gegenseitig beeinflussende Bindung in der zentralen Pore und den Seitentaschen. Wird durch zielgerichtete Mutagenese eine der Bindungsstellen zerstört, so entfällt auch die hohe Kooperativität. (6) Durch zielgerichtete Mutagenese des Kv2.1-Ionenkanals zum Kv2.1 ZK+ST-Ionenkanal wurden sowohl die hohe Psora-4-Affinität als auch die hohe Kooperativität eingefügt.

4.1.2 Die Ergebnisse des computergestützten Liganden-Dockings und der MDss

Die Ergebnisse der computergestützten Liganden-Dockings und der MDss bestätigen größtenteils die Kontakte mit Aminosäuren, die bereits mit den TEVC-Experimenten identifiziert wurden. Die MDss ergaben jedoch keinen Kontakt von Psora-4 und I502 (S6). Der Rest dieser Aminosäure ist jedoch weder in die zentrale Kavität noch in die hydrophobe Seitentasche gerichtet, sondern in laterale Öffnungen zwischen beiden Bindungsstellen. Somit ist anzunehmen, dass I502 nicht zur Psora-4-Bindungsstelle gehört, sondern für den Durchgang zwischen den Bindungsstellen von Bedeutung ist.

Im S4-Segment wurde mit den Dockings und MDss im Gegensatz zu den TEVC-Experimenten kein Kontakt zwischen Psora-4 und K412 und H416 festgestellt. Die Reste dieser Aminosäuren sind im Modell aus der hydrophoben Seitentasche herausgedreht. Das S4-Segment ist der Spannungssensor des Ionenkanals und rotiert wahrscheinlich schraubenartig, wenn die Spannung über der Membran sich entsprechend ändert. Die Modelle zeigen die offene Konformation des Ionenkanals und somit die aktivierte Position der S4-Segmente. Das Schließen des Ionenkanals und die Verschiebungen der Segmente in den geschlossenen Zustand könnten aber dazu führen, dass sich K412 und H416 in die hydrophobe Seitentasche hinein drehen. Diese Erklärung passt gut zu dem Modell des geschlossenen Zustands des Ionenkanals, das von Pathak et al. erarbeitet wurde (Pathak et al, 2007). In dieser Studie wird beschrieben, dass die Aminosäure, die K412 entspricht, durch die Rotation des S4-Segments in Richtung des S4-S5-Linkers und somit in die hydrophoben Seitentaschen gedreht wird. Die geschlossene Konformation und auch die genaue Drehbewegung des Spannungssensors sind jedoch nicht im Detail bekannt und Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussion.

4.1.3 Der Inhibitionsmechanismus

Die Daten aus den Alanin-Scans des S4-Segments, des S4-S5-Linkers, des S5-Segments und des S6-Segments sowie die computergestützten Liganden-Dockings zeigen, dass Psora-4 sowohl in der zentralen Kavität als auch in den hydrophoben Seitentaschen bindet. Die MDss wiesen außerdem auf die

Möglichkeit hin, dass Psora-4-Moleküle in den hydrophoben Seitentaschen gebunden sind und dabei die Porenschleifen erreichen können. Diese Hypothese wurde durch den Alanin-Scan des Abschnitts der Porenschleifen, auf den die MDss hingewiesen hatten, und die Experimente mit den A503V/I/L-Mutanten bestätigt. Demnach drückt Psora-4 von der „Rückseite“ aus auf die Porenschleifen und könnte so einen Porenkollaps am Selektivitätsfilter hervorrufen und den Ionenkanal blockieren. Mutationen in den Bindungsstellen in den hydrophoben Seitentaschen führen zu einem dominant-negativen Effekt auf den Psora-4-Block. Psora-4 muss also in mehreren Seitentaschen binden, um den Ionenkanal blockieren zu können.

Die weitere Klärung des Blockmechanismus ergab, dass weder die QV-Beziehung noch die GV-Beziehung durch Psora-4 verändert wurden. Somit liegt dem Psora-4-Block weder eine Arretierung des S4-Segments noch eine elektromechanische Entkopplung der Bewegung des Spannungssensors von der Bewegung der porenformenden Domänen zu Grunde. Weiterhin favorisiert Psora-4 nicht die Bindung an bereits inaktivierte Ionenkanäle.

Werden die Kv1.5-Ionenkanäle mit TEA, einem Blocker des offenen Ionenkanals, blockiert, so kann Psora-4 anschließend diese vorblockierten Ionenkanäle nicht mehr inhibieren. Dies könnte auf eine Konkurrenz um die Bindungsstelle in der zentralen Kavität oder auf die Stabilisierung des Selektivitätsfilters zurückzuführen sein. TPA hingegen stabilisiert den Selektivitätsfilter nicht, sondern besetzt nur die zentrale Pore des Ionenkanals. Es wurde gezeigt, dass Psora-4 in den Seitentaschen die Inaktivierungs-ähnliche Blockade auslösen kann, wenn TPA die zentrale Pore blockiert. Die Bindung von Psora-4 an die zentrale Pore und die hydrophoben Seitentaschen induziert die Bildung eines stabilen, inaktivierten Komplexes aus Psora-4 und dem Ionenkanal. Dieser Blockmechanismus, der als kumulative Inaktivierung bezeichnet werden kann, wurde somit erstmals beschrieben.

4.2 Die Interaktion von Kv-Kanälen mit Arachidonsäure

4.2.1 HUFAs binden in der zentralen Pore des offenen Ionenkanals

Die Interaktion von Kv-Kanälen und HUFAs ist Gegenstand aktueller Forschung. Die Beobachtung, dass editierte I400V-Ionenkanäle im Gegensatz zum nicht editierten Kv1.1-Ionenkanal nicht durch HUFAs inhibiert werden konnten, wurde zum Schlüsselexperiment und Ausgangspunkt der weiteren Erforschung der Inhibition von Kv1-Ionenkanälen durch HUFAs.

HUFAs blockieren den offenen Ionenkanal („open channel block“), indem sie in die zentrale Kavität gelangen und dort eine Inaktivierungs-ähnliche Inhibition auslösen. Dabei binden sie an die Reste der Aminosäuren, die die zentrale Pore auskleiden: V505, I508, V512 und V516 (Decher et al, 2010; Moreno-Galindo et al, 2010). HUFAs blockieren damit die Passage von Kalium-Ionen durch den Ionenkanal (Decher et al, 2010).

4.2.2 Die Interaktionen von Aa und den Ionenkanälen ist nicht auf die zentrale Pore beschränkt

Die Studie zur überraschenden Kv1-Spezifität von Psora-4 zeigt, dass eine Interaktion zwischen dem Ionenkanal und kleinen, lipophilen Inhibitoren auch außerhalb der zentralen Ionenkanalpore stattfindet. Es lag die Vermutung nahe, dass auch HUFAs, wie z.B. Aa, außerhalb der zentralen Ionenkanalpore mit den Ionenkanälen interagieren können.

Um die Domänen und darin einzelne Aminosäuren zu identifizieren, die für die Interaktion mit Aa von Bedeutung sind, wurde ein systematischer Alanin-Scan des S3-S4-Linkers, des S4-Segments, des S4-S5-Linkers, des S5-Segments, der Porenschleifen und des S6-Segments durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion nicht auf die zentrale Pore und auch nicht auf ein anderes einzelnes Segment begrenzt ist, sondern viele Aminosäuren in allen untersuchten Segmenten eine Rolle spielen. Neben Aminosäuren im S6-Segment sind auch Aminosäuren in den hydrophoben Seitentaschen, den lateralen Fenstern, dem Spannungssensor und in den extrazellulären Bereichen für die Inhibition durch Aa von Bedeutung.

4.2.3 Der Effekt von Aa auf die Ionenkanäle ist nicht auf die Interaktion mit wenigen Aminosäuren zurückzuführen

Es wurde vermutet, dass die Interaktion von PUFAs und Kv-Ionenkanälen vor allem auf eine Interaktion der PUFAs mit dem äußeren Ende des S4-Segments zurückzuführen ist (Börjesson & Elinder, 2011). Der Aminosäure R1, die R400 in Kv1.5-Ionenkanälen entspricht, kommt in dieser Studie dabei die größte Bedeutung zu. Die Analyse des systematischen Alanin-Scans hingegen zeigt zwar, dass Aa weniger Inaktivierung induzieren kann, wenn der Ionenkanal zu R400A mutiert ist, jedoch sind die Inhibition, die Veränderung des Peakstroms und die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit im Vergleich zum Kv1.5-WT-Ionenkanal nicht signifikant verändert. Damit ist R400 an der Interaktion mit Aa wohl beteiligt, ohne dass dieser Aminosäure jedoch eine Schlüsselrolle zukommt. In der Studie von Borjesson et al. wurden insgesamt 17 Ionenkanalmutanten untersucht, von denen fünf eine Interaktionsstelle für PUFAs bilden und vor allem für die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit durch PUFAs von Bedeutung sein sollen. Diese fünf befinden sich alle am oberen, äußeren Ende des S4-Segments. Der systematische Alanin-Scan der hier vorliegenden Arbeit umfasst 132 Ionenkanalmutanten und zeigt so eine umfassenderes Bild der Interaktion, die sich über alle untersuchten Segmente erstreckt. Das Zuordnen einzelner Bestandteile des Effekts auf bestimmte Abschnitte des Ionenkanals ist nicht möglich. Somit muss jede Studie, die nur ausgewählte Stellen des Ionenkanals in die Analyse aufnimmt, mit großer Vorsicht interpretiert werden.

4.2.4 Lipide sind für die Funktion des spannungsgesteuerten Ionenkanals von entscheidender Bedeutung

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle liegen in der Zellmembran vor, so dass Lipide das normale Umfeld dieser Ionenkanäle sind. Somit könnte die Präsenz von Lipiden um den Ionenkanal herum und in bestimmten Bereichen zwischen den Segmenten erforderlich sein, um das korrekte Öffnen und Schließen des Ionenkanals zu ermöglichen.

Aa gleicht die durch die Mutation verschobenen $V_{1/2}$ -Werte so aus, dass der $V_{1/2}$ -Wert von Kv1.5-Ionenkanalmutanten mit positiv verschobenem $V_{1/2}$ -Wert

durch die Applikation von Aa negativer wird, während der $V_{1/2}$ -Wert von Kv1.5-Ionenkanalmutanten mit negativ verschobenem $V_{1/2}$ -Wert durch Aa positiver wird. Dies wurde in dieser Arbeit für den Spannungssensor und die umliegenden Linker gezeigt. Das Ergebnis weist darauf hin, dass Aa für das korrekte Öffnen und Schließen des Kv-Kanals von Bedeutung ist. Es bestätigt frühere Studien, die zeigten, dass Interaktionen zwischen den spannungswahnehmenden Segmenten und den Lipiden für die elektromechanische Kopplung zwischen der Bewegung des Spannungssensors und den Porendomänen von entscheidender Bedeutung sind (Schmidt et al, 2006). Auch zeigte die Kristallstruktur des rKv1.2-Ionenkanals, dass sich Lipide vor allem in den konkaven Rundungen in der Nähe der Spannungssensoren und damit den hydrophoben Seitentaschen anlagern (**Abb. 4.2.4-1**) (Long et al, 2007). Die Autoren vermuten, dass die angelagerten Lipide ein wesentlicher Bestandteil dieser Membran-Protein-Struktur sind, zur Stabilität beitragen und mit dem Ionenkanal interagieren (Long et al, 2007).

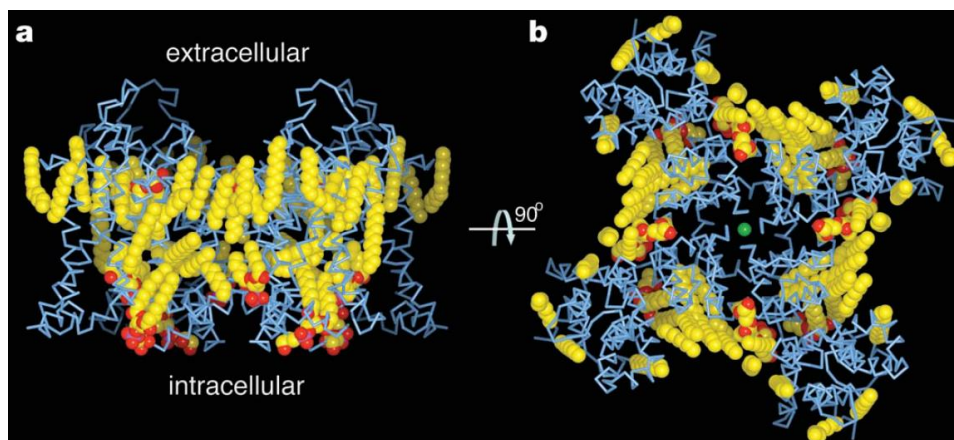


Abbildung 4.2.4-1: Lipide in der Kristallstruktur des rKv1.2-Ionenkanals

Die Abbildung zeigt die Kristallstruktur des rKv1.2-Ionenkanals aus (a) seitlicher und (b) extrazellulärer Perspektive. K⁺-Ionen sind als grüne Kreise, die Segmente des Ionenkanals als blaue Bänder und die Lipide in gelb/rot dargestellt (Long et al, 2007).

Auch Studien, die sich mit der Interaktion zwischen Lipiden und dem kristallisierten KcsA-Ionenkanal befassten, kommen zu dem Ergebnis, dass die

Interaktion mit Lipiden für das korrekte Öffnen und Schließen wesentlich ist (Marius et al, 2008; Valiyaveetil et al, 2002).

Ein weiterer Hinweis auf die ausschlaggebende Bedeutung von Lipiden innerhalb des Ionenkanals ist durch die lateralen Fenster gegeben. Die Analyse zeigt, dass auch Aminosäuren, deren Reste in die lateralen Fenster gerichtet sind, die Interaktion mit Aa beeinflussen. Somit wird das Ergebnis der Studie zur Kristallstruktur des NavAB-Ionenkanals bestätigt (Payandeh et al, 2011), dass diese lateralen Fenster auch für Lipide einen Durchgang von den hydrophoben Seitentaschen, die den unteren Teil des S4-Segments beinhalten, in die zentrale Pore bilden.

4.2.5 Der Selektivitätsfilter ist für die Interaktion mit Aa von Bedeutung

Es war bekannt, dass die durch Aa-induzierte Inaktivierungs-ähnliche Inhibition von den Ionen abhängt, die den Ionenkanal passieren. Auch wurde bereits gezeigt, dass die Passage von Rubidium-Ionen die Aa-induzierte Inaktivierung verhindert (Oliver et al, 2004). Daher schien es wahrscheinlich, dass für die Modulation der Ionenkanäle durch Aa die Interaktion mit dem Selektivitätsfilter wichtig ist. Die Ergebnisse des Alanin-Scans bestätigen diese Ergebnisse und zeigen ebenfalls die Bedeutung des Selektivitätsfilters auf.

4.3 Hydrophobe Seitentaschen als Medikamenten-Bindungsstellen

In der Literatur finden sich mehrere Hinweise darauf, dass Aminosäuren, deren Reste im S6-Segment außerhalb der zentralen Pore oder im S5-Segment liegen, an der Interaktion von Inhibitoren mit spannungsgesteuerten Ionenkanälen beteiligt sind. Daher könnten die hydrophoben Seitentaschen generell für die Pharmakologie von spannungsgesteuerten Kalium-, Natrium- und Kalzium-Kanälen von Bedeutung sein.

4.3.1 Der Kv1.3-Inhibitor PAP-1

Die selektive Inhibition von Kv1.3-Ionenkanälen könnte zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie multipler Sklerose oder Typ1-Diabetes eingesetzt werden (Beeton et al, 2006). Der Inhibitor 5-(4-phenoxybutoxy)psoralen PAP-1 wurde als spezifischer Inhibitor des Kv1.3-Ionenkanals identifiziert (Schmitz et al, 2005). PAP-1 inhibiert Kv1.3-Ionenkanäle in Ganzzellstrommessungen mit der Patch-Clamp-Technik („whole-cell patch-clamp“) mit einem IC_{50} -Wert von 2 nM (Schmitz et al, 2005).

PAP-1 blockiert den Kv1.3-Ionenkanal mit einem Hill-Koeffizienten von 2, so dass die Autoren der Studie vermuteten, dass mehrere PAP-1-Moleküle gleichzeitig mit dem Kv1.3-Ionenkanal interagieren könnten. In einer weiteren Studie wurde dann mittels eines Ionenkanalmodells eine mögliche Interaktion zwischen PAP-1 und Kv1.3-Ionenkanälen ermittelt (Zimin et al, 2010). Die hohe Kooperativität konnte damit erklärt werden, dass zwei oder vier PAP-1-Moleküle in der zentralen Pore binden. Das Modell zeigt, dass die PAP-1-Moleküle zwischen den S5- und S6-Segmenten hindurch in den Bereich auf der der Pore abgewandten Seite dieser Segmente ragen (**Abb. 4.3.1-1**). Es ist also möglich, dass sie mit Aminosäureresten auf der „Rückseite“ der S5- und S6-Segmente interagieren.

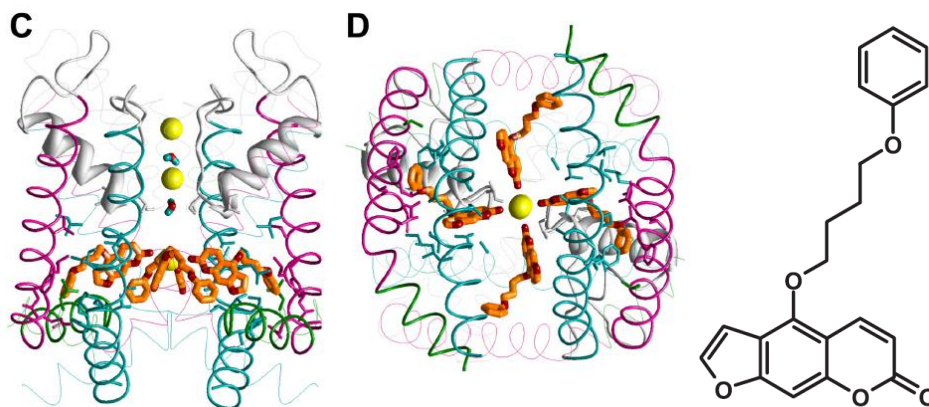


Abbildung 4.3.1-1: Die Interaktion von PAP-1 mit dem Kv1.3-Ionenkanal

Die Abbildung zeigt das verwendete Modell des Kv1.3-Ionenkanals mit vier PAP-1-Molekülen (rot-orange) aus (C, links) seitlicher oder (D, Mitte) intrazellulärer Perspektive. Die S4-S5-Linker sind grün, die S5-Segmente magenta, die S6-Segmente türkis und die Porenschleifen grau dargestellt. K^+ -Ionen sind gelb gezeigt. Rechts ist die Strukturformel des Kv1.3-Inhibitors PAP-1 gezeigt (Zimin et al, 2010).

Das Modell weist auf mehrere Aminosäurereste hin, die sich im Bereich um 5 Å um die PAP-1-Moleküle befanden und mit ihnen interagieren können. Weiterhin zeigten Ganzzellstrommessungen, dass Mutationen in diesem Bereich sich auf die Interaktion zwischen PAP-1 und dem Kv1.3-Ionenkanal auswirken.

Insgesamt ergibt die Studie Hinweise auf eine Interaktion von PAP-1 mit Aminosäureresten, die sich in den hydrophoben Seitentaschen, den lateralen Fenstern und der zentralen Kavität befinden. So wurde beispielsweise die Aminosäure L335 identifiziert, die sich im S4-S5-Linker befindet und L423 im Kv1.5-Ionenkanal homolog ist. Diese gehört zur Psora-4-Bindungsstelle in der hydrophoben Seitentasche. Weiterhin wurden L349 und F352 im S5-Segment identifiziert, die im Kv1.5-Ionenkanal L437 und F440 entsprechen und deren Mutation sich sowohl auf die Interaktion mit Psora-4 als auch auf die mit Aa auswirkt. Beide Aminosäurereste befinden sich in den hydrophoben Seitentaschen. Die Mutation der Aminosäure I414 führt ebenfalls zu einer Veränderung der PAP-1-Potenz. I414 entspricht im Kv1.5-Ionenkanal I502 und eine Mutation wirkt sich ebenfalls auf die Interaktion mit Psora-4 und Aa aus. I504 bzw. I414 ragt in die lateralen Fenster, die die hydrophoben Seitentaschen mit der zentralen Kavität verbinden. Auch die Aminosäurereste von T419 und L422, die auf der der Pore abgewandten Seite des S6-Segments lokalisiert sind und im Kv1.5-Ionenkanal T507 und L510 homolog sind, wurden als mögliche Interaktionspartner von PAP-1 identifiziert. Auch diese beiden Aminosäuren sind in die hydrophoben Seitentaschen gerichtet und für die Interaktion mit Psora-4 und Aa von entscheidender Bedeutung.

Dennoch kommen die Autoren dieser Studie nicht zu dem Schluss, dass PAP-1-Moleküle mit einer weiteren Bindungsstelle im Kv1.3-Ionenkanal interagieren, die außerhalb der zentralen Ionenkanalpore liegt. Das hier verwendete Modell basiert zwar auf der Kristallstruktur des rKv1.2-Ionenkanals (Long et al, 2005), jedoch wurde eine Bindungsstelle außerhalb der Pore nicht in Betracht gezogen. Daher beinhaltet das verwendete Modell keine S4-Segmente und übersieht damit zwangsläufig die hydrophoben Seitentaschen.

4.3.2 Hydrophobe Seitentaschen in Natrium- und Kalzium-Kanälen

Bisherige Studien zur Interaktion zwischen Ionenkanalblockern und spannungsgesteuerten Natrium- oder Kalzium-Kanälen liefern Hinweise darauf, dass auch Aminosäuren zur Bindungsstelle gehören, die nicht auf der der Pore zugewandten Seite der S6-Segmente liegen (Grabner et al, 1996; Huber et al, 2000; Mitterdorfer et al, 1996; Nau & Wang, 2004; Striessnig et al, 1998). Bisher konnten diese Hinweise jedoch nicht interpretiert werden, da lediglich von einer Interaktion mit der zentralen Ionenkanalpore ausgegangen wurde und eine weitere Bindungsstelle auf der der Pore abgewandten Seite von den S6-Segmenten nicht in Betracht gezogen wurde.

Beispielsweise beinhaltet die Bindungsstelle von Dihydropyridin (DHP) im L-Typ-Kalzium-Kanal neben Aminosäuren der S6-Segmente auch Aminosäuren, die im S5-Segment lokalisiert sind (Grabner et al, 1996). Weitere Studien zeigen, dass die identifizierten Aminosäuren im S5- und S6-Segment auf der „Rückseite“ dieser Segmente liegen (Huber et al, 2000) (**Abb. 4.3.2-1**).

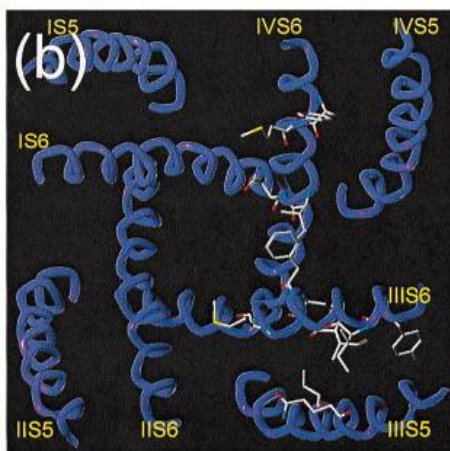


Abbildung 4.3.2-1: Modell der Dihydropyridin-Bindungsstelle

Das Modell basiert auf der KcsA-Kristallstruktur und beinhaltet S5- und S6-Segmente. Die DHP-Bindungsstelle ist hervorgehoben (Huber et al, 2000).

In spannungsgesteuerten Natriumkanälen wurden bisher nur Aminosäuren des S6-Segments als Bindungsstelle beschrieben. Jedoch zeigen auch diese Studien, dass nicht alle der identifizierten Aminosäurereste in die zentrale Ionenkanalpore gerichtet sind. So gehören beispielsweise Aminosäuren, die L510 im Kv1.5-Ionenkanal homolog sind, zur Bindungsstelle der Lokalanästhetika (Nau & Wang, 2004).

Die hydrophoben Seitentaschen könnten somit von genereller Relevanz für die Pharmakologie der spannungsgesteuerten Natrium- und Kalziumkanäle sein.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die hydrophoben Seitentaschen als Bindungsstellen in Kv-Kanälen sowohl für Psora-4 als auch für Aa und ein bisher unbekannter Inhibitionsmechanismus, die kumulative Inaktivierung, identifiziert werden.

Die Bindungsstellen in den hydrophoben Seitentaschen sind, im Gegensatz zu der Bindungsstelle in der zentralen Pore, nicht hochkonserviert. Die überraschende Kv1-Spezifität von Psora-4 ist darauf zurückzuführen, dass Psora-4 nicht nur in der zentralen Kavität, sondern auch in den hydrophoben Seitentaschen bindet. Somit konnte hier eine neue Möglichkeit für das Design von selektiven Ionenkanalblockern aufgezeigt werden, die sich zur Behandlung häufiger kardialer, neurologischer und entzündlicher Erkrankungen eignen könnten.

Der systematische Ansatz zur Untersuchung der Interaktion von Kv-Kanälen mit PUFAs zeigt, dass diese wesentlich komplexer ist, als bisher angenommen. Es konnte gezeigt werden, dass neben der zentralen Kavität auch die lateralen Fenster, die hydrophoben Seitentaschen, der Spannungssensor, die Porenschleifen und auch extrazelluläre Bereiche eine entscheidende Rolle spielen. Es ist nicht möglich, einzelne Aminosäuren aus ausgewählten Segmenten zu untersuchen und daraus generelle Schlüsse über die Interaktion zwischen den Ionenkanälen und PUFAs zu ziehen, da die Interaktion mit PUFAs nicht auf wenige Abschnitte im Ionenkanal begrenzt ist. Weitere Studien könnten den Inhibitionsmechanismus der PUFAs an Kv-Kanälen weiter aufklären und dabei die komplexe Interaktion berücksichtigen.

Auch die lateralen Fenster zwischen den hydrophoben Seitentaschen und dem Lumen der zentralen Kavität können in Zukunft auf ihre Bedeutung als Verbindung zwischen beiden Bindungsstellen für unterschiedliche Inhibitoren untersucht werden.

Es ist wahrscheinlich, dass die hydrophoben Seitentaschen generell in der Pharmakologie von spannungsgesteuerten Ionenkanälen eine wichtige Rolle spielen. In zukünftigen Studien könnten die bisherigen Studien zur Interaktion zwischen spannungsgesteuerten Kalium-, Natrium- und Kalzium-Kanälen neu

interpretiert bzw. erweitert werden, um die Rolle der hydrophoben Seitentaschen zu untersuchen.

5 Literaturverzeichnis

Aggarwal SK, MacKinnon R (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**: 1169-1177

Ahern CA, Horn R (2005) Focused electric field across the voltage sensor of potassium channels. *Neuron* **48**: 25-29

Aiyar J, Nguyen AN, Chandy KG, Grissmer S (1994) The P-region and S6 of Kv3.1 contribute to the formation of the ion conduction pathway. *Biophys J* **67**: 2261-2264

Arias C, Guizy M, David M, Marzian S, Gonzalez T, Decher N, Valenzuela C (2007) Kvbeta1.3 reduces the degree of stereoselective bupivacaine block of Kv1.5 channels. *Anesthesiology* **107**: 641-651

Armstrong CM, Bezanilla F (1974) Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. *J Gen Physiol*. **63**:533-52

Armstrong CM, Hille B (1972) The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. *J Gen Physiol* **59**: 388-400

Baukrowitz T, Yellen G (1996) Two functionally distinct subsites for the binding of internal blockers to the pore of voltage-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13357-13361

Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Beraud E (2001) Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13942-13947

Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, LeeHealey CJ, S Andrews B, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, Knaus HG, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy KG (2006) Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17414-17419

Bentzen BH, Nardi A, Calloe K, Madsen LS, Olesen SP, Grunnet M (2007) The small molecule NS11021 is a potent and specific activator of Ca²⁺-activated big-conductance K⁺ channels. *Mol Pharmacol* **72**: 1033-1044

Beraud E, Viola A, Regaya I, Confort-Gouny S, Siaud P, Ibarrola D, Le Fur Y, Barbaria J, Pellissier JF, Sabatier JM, Medina I, Cozzone PJ (2006) Block of neural Kv1.1 potassium channels for neuroinflammatory disease therapy. *Ann Neurol* **60**: 586-596

Bezanilla F, Armstrong CM (1974) Gating currents of the sodium channels: three ways to block them. *Science* **183**:753-4

- Bhalla T, Rosenthal JJ, Holmgren M, Reenan R (2004) Control of human potassium channel inactivation by editing of a small mRNA hairpin. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 950-956
- Boland LM, Drzewiecki MM (2008) Polyunsaturated fatty acid modulation of voltage-gated ion channels. *Cell Biochem Biophys* **52**: 59-84
- Borjesson SI, Hammarstrom S, Elinder F (2008) Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids. *Biophys J* **95**: 2242-2253
- Borjesson SI, Parkkari T, Hammarstrom S, Elinder F Electrostatic tuning of cellular excitability. *Biophys J* **98**: 396-403
- Butler A, Wei A, Salkoff L (1990) Shal, Shab, and Shaw: three genes encoding potassium channels in Drosophila. *Nucleic Acids Res* **18**: 2173-2174
- Börjesson SI, Elinder F (2011) An electrostatic potassium channel opener targeting the final voltage sensor transition. *J Gen Physiol* **137**: 563-577
- Börjesson SI, Parkkari T, Hammarström S, Elinder F (2010) Electrostatic tuning of cellular excitability. *Biophys J* **98**: 396-403
- Caballero R, Moreno I, Gonzalez T, Valenzuela C, Tamargo J, Delpon E (2002) Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* **56**: 104-117
- Cahalan MD, Chandy KG, DeCoursey TE, Gupta S (1985) A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J Physiol* **358**: 197-237
- Casis O, Olesen SP, Sanguinetti MC (2006) Mechanism of action of a novel human ether-a-go-go-related gene channel activator. *Mol Pharmacol* **69**: 658-665
- Castle NA (1990) Bupivacaine inhibits the transient outward K⁺ current but not the inward rectifier in rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **255**: 1038-1046
- Chanda B, Asamoah OK, Blunck R, Roux B, Bezanilla F (2005) Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* **436**: 852-856
- Chesnoy-Marchais D, Fritsch J (1994) Concentration-dependent modulations of potassium and calcium currents of rat osteoblastic cells by arachidonic acid. *J Membr Biol* **138**: 159-170
- Choi E, Abbott GW (2007) The MiRP2-Kv3.4 potassium channel: muscling in on Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* **72**: 499-501

Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP (1990) Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* **4**: 405-411

Clarkson CW, Hondeghem LM (1985) Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. *Anesthesiology* **62**: 396-405

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**: 233-285

Decher N, Gonzalez T, Streit AK, Sachse FB, Renigunta V, Soom M, Heinemann SH, Daut J, Sanguinetti MC (2008) Structural determinants of Kv β 1.3-induced channel inactivation: a hairpin modulated by PIP₂. *Embo J* **27**: 3164-3174

Decher N, Kumar P, Gonzalez T, Pirard B, Sanguinetti MC (2006) Binding site of a novel Kv1.5 blocker: a "foot in the door" against atrial fibrillation. *Mol Pharmacol* **70**: 1204-1211

Decher N, Kumar P, Gonzalez T, Renigunta V, Sanguinetti MC (2005) Structural basis for competition between drug binding and Kv β 1.3 accessory subunit-induced N-type inactivation of Kv1.5 channels. *Mol Pharmacol* **68**: 995-1005

Decher N, Pirard B, Bundis F, Peukert S, Baringhaus KH, Busch AE, Steinmeyer K, Sanguinetti MC (2004) Molecular basis for Kv1.5 channel block: conservation of drug binding sites among voltage-gated K⁺ channels. *J Biol Chem* **279**: 394-400

Decher N, Streit AK, Rapedius M, Netter MF, Marzian S, Ehling P, Schlichthorl G, Craan T, Renigunta V, Kohler A, Dodel RC, Navarro-Polanco RA, Preisig-Muller R, Klebe G, Budde T, Baukowitz T, Daut J (2010) RNA editing modulates the binding of drugs and highly unsaturated fatty acids to the open pore of Kv potassium channels. *EMBO J* **29**: 2101-2113

del Camino D, Holmgren M, Liu Y, Yellen G (2000) Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications. *Nature* **403**: 321-325

del Camino D, Kanevsky M, Yellen G (2005) Status of the intracellular gate in the activated-not-open state of shaker K⁺ channels. *J Gen Physiol* **126**: 419-428

del Camino D, Yellen G (2001) Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K⁽⁺⁾ channel. *Neuron* **32**: 649-656

Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77

- Eldstrom J, Wang Z, Xu H, Pourrier M, Ezrin A, Gibson K, Fedida D (2007) The molecular basis of high-affinity binding of the antiarrhythmic compound vernakalant (RSD1235) to Kv1.5 channels. *Mol Pharmacol* **72**: 1522-1534
- England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM (1995) Characterization of a voltage-gated K⁺ channel beta subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6309-6313
- Farooqui AA, Horrocks LA (2006) Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist* **12**: 245-260
- Fedida D, Hesketh JC (2001) Gating of voltage-dependent potassium channels. *Prog Biophys Mol Biol.* **75**:165-99
- Franqueza L, Longobardo M, Vicente J, Delpon E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, Valenzuela C (1997) Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res* **81**: 1053-1064
- Gandhi CS, Clark E, Loots E, Pralle A, Isacoff EY (2003) The orientation and molecular movement of a k(+) channel voltage-sensing domain. *Neuron* **40**: 515-525
- Gonzalez T, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpon E, Tamargo J, Valenzuela C (2002a) Effects of levobupivacaine, ropivacaine and bupivacaine on HERG channels: stereoselective bupivacaine block. *Br J Pharmacol* **137**: 1269-1279
- Gonzalez T, Navarro-Polanco R, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpon E, Tamargo J, Tamkun MM, Valenzuela C (2002b) Assembly with the Kvbeta1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels. *Mol Pharmacol* **62**: 1456-1463
- Grabner M, Wang Z, Hering S, Striessnig J, Glossmann H (1996) Transfer of 1,4-dihydropyridine sensitivity from L-type to class A (BI) calcium channels. *Neuron* **16**: 207-218
- Hanner M, Green B, Gao YD, Schmalhofer WA, Matyskiela M, Durand DJ, Felix JP, Linde AR, Bordallo C, Kaczorowski GJ, Kohler M, Garcia ML (2001) Binding of correolide to the K(v)1.3 potassium channel: characterization of the binding domain by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **40**: 11687-11697
- Hansen RS, Diness TG, Christ T, Wettwer E, Ravens U, Olesen SP, Grunnet M (2006) Biophysical characterization of the new human ether-a-go-go-related gene channel opener NS3623 [N-(4-bromo-2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl)-N'-(3'-trifluoromethylphenyl)urea]. *Mol Pharmacol* **70**: 1319-1329
- Hartmann HA, Kirsch GE, Drewe JA, Taglialatela M, Joho RH, Brown AM (1991) Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science* **251**: 942-944

Heginbotham L, Abramson T, MacKinnon R (1992) A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**: 1152-1155

Heinemann SH, Rettig J, Graack HR, Pongs O (1996) Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *J Physiol* **493 (Pt 3)**: 625-633

Hockerman GH, Dilmac N, Scheuer T, Catterall WA (2000) Molecular determinants of diltiazem block in domains IIS6 and IVS6 of L-type Ca(2⁺) channels. *Mol Pharmacol* **58**: 1264-1270

Honore E, Barhanin J, Attali B, Lesage F, Lazdunski M (1994) External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K⁺ channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 1937-1941

Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**: 533-538

Huber I, Wappl E, Herzog A, Mitterdorfer J, Glossmann H, Langer T, Striessnig J (2000) Conserved Ca²⁺-antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridine-binding domain. *Biochem J* **347 Pt 3**: 829-836

Isacoff EY, Jan YN, Jan LY (1990) Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* **345**: 530-534

Kamb A, Iverson LE, Tanouye MA (1987) Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* **50**: 405-413

Kang J, Chen XL, Wang H, Ji J, Cheng H, Incardona J, Reynolds W, Viviani F, Tabart M, Rampe D (2005) Discovery of a small molecule activator of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) cardiac K⁺ channel. *Mol Pharmacol* **67**: 827-836

Kang JX, Leaf A (1996) Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na⁺ channels by directly binding to the channel proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3542-3546

Kirsch GE, Shieh CC, Drewe JA, Vener DF, Brown AM (1993) Segmental exchanges define 4-aminopyridine binding and the inner mouth of K⁺ pores. *Neuron* **11**: 503-512

Kotelko DM, Shnider SM, Dailey PA, Brizgys RV, Levinson G, Shapiro WA, Koike M, Rosen MA (1984) Bupivacaine-induced cardiac arrhythmias in sheep. *Anesthesiology* **60**: 10-18

Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M (2000) Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J* **19**: 1784-1793

Leaf A, Xiao YF, Kang JX, Billman GE (2003) Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Ther* **98**: 355-377

Ledwell JL, Aldrich RW (1999) Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J Gen Physiol* **113**: 389-414

Lefevre F, Aronson N (2000) Ketogenic diet for the treatment of refractory epilepsy in children: A systematic review of efficacy. *Pediatrics* **105**: E46

Leifert WR, McMurchie EJ, Saint DA (1999) Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol* **520 Pt 3**: 671-679

Lipka LJ, Jiang M, Tseng GN (1998) Differential effects of bupivacaine on cardiac K channels: role of channel inactivation and subunit composition in drug-channel interaction. *J Cardiovasc Electrophysiol* **9**: 727-742

Liu Y, Jurman ME, Yellen G (1996) Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron* **16**: 859-867

Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**: 897-903

Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* **450**: 376-382

Lopez GA, Jan YN, Jan LY (1994) Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K⁺ channel comprises part of the pore. *Nature* **367**: 179-182

Lu Z, Klem AM, Ramu Y (2002) Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J Gen Physiol* **120**: 663-676

Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**: 587-591

Lundbaek JA (2008) Lipid bilayer-mediated regulation of ion channel function by amphiphilic drugs. *J Gen Physiol* **131**: 421-429

Mackay K, Mochly-Rosen D (2001) Arachidonic acid protects neonatal rat cardiac myocytes from ischaemic injury through epsilon protein kinase C. *Cardiovasc Res* **50**: 65-74

MacKinnon R (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**: 232-235

MacKinnon R, Heginbotham L, Abramson T (1990) Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor. *Neuron* **5**: 767-771

MacKinnon R, Yellen G (1990) Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science* **250**: 276-279

Marius P, Zagnoni M, Sandison ME, East JM, Morgan H, Lee AG (2008) Binding of anionic lipids to at least three nonannular sites on the potassium channel KcsA is required for channel opening. *Biophys J* **94**: 1689-1698

Marom S, Goldstein SA, Kupper J, Levitan IB (1993) Mechanism and modulation of inactivation of the Kv3 potassium channel. *Receptors Channels* **1**: 81-88

Marquez MF, Salica G, Hermosillo AG, Pastelin G, Gomez-Flores J, Nava S, Cardenas M (2007) Ionic basis of pharmacological therapy in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* **18**: 234-240

Marzian S. (2009) Diplomarbeit: Systematische Analyse der Bupivacain-Bindungsstelle im Kv1.5-Ionenkanal.

Marzian S, Stansfeld PJ, Rapedius M, Rinné S, Nematian-Ardestani E, Abbruzzese JL, Steinmeyer K, Sansom MS, Sanguinetti MC, Baukrowitz T, Decher N (2013) Side pockets provide the basis for a new mechanism of Kv channel-specific inhibition. *Nat Chem Biol* **9**: 507-513

Meves H (2008) Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br J Pharmacol* **155**: 4-16

Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC (2000) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12329-12333

Mitterdorfer J, Wang Z, Sinnegger MJ, Hering S, Striessnig J, Grabner M, Glossmann H (1996) Two amino acid residues in the III_{S5} segment of L-type calcium channels differentially contribute to 1,4-dihydropyridine sensitivity. *J Biol Chem* **271**: 30330-30335

Moreno-Galindo EG, Barrio-Echavarría GF, Vásquez JC, Decher N, Sachse FB, Tristani-Firouzi M, Sánchez-Chapula JA, Navarro-Polanco RA (2010) Molecular basis for a high-potency open-channel block of Kv1.5 channel by the endocannabinoid anandamide. *Mol Pharmacol* **77**: 751-758

Nau C, Wang GK (2004) Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na⁺ channels. *J Membr Biol* **201**: 1-8

Nau C, Wang SY, Strichartz GR, Wang GK (2000) Block of human heart hH1 sodium channels by the enantiomers of bupivacaine. *Anesthesiology* **93**: 1022-1033

Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al. (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**: 121-127

Oliver D, Lien CC, Soom M, Baukrowitz T, Jonas P, Fakler B (2004) Functional conversion between A-type and delayed rectifier K⁺ channels by membrane lipids. *Science* **304**: 265-270

Pathak M, Kurtz L, Tombola F, Isacoff E (2005) The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel. *J Gen Physiol* **125**: 57-69

Pathak MM, Yarov-Yarovoy V, Agarwal G, Roux B, Barth P, Kohout S, Tombola F, Isacoff EY (2007) Closing in on the resting state of the Shaker K(+) channel. *Neuron* **56**: 124-140

Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**: 353-358

Phillips LR, Milesu M, Li-Smerin Y, Mindell JA, Kim JI, Swartz KJ (2005) Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo. *Nature* **436**: 857-860

Popot JL, Changeux JP (1984) Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of an oligomeric integral membrane protein. *Physiol Rev* **64**: 1162-1239

Posson DJ, Ge P, Miller C, Bezanilla F, Selvin PR (2005) Small vertical movement of a K⁺ channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer. *Nature* **436**: 848-851

Potter PJ, Hayes KC, Segal JL, Hsieh JT, Brunnemann SR, Delaney GA, Tierney DS, Mason D (1998) Randomized double-blind crossover trial of fampridine-SR (sustained release 4-aminopyridine) in patients with incomplete spinal cord injury. *J Neurotrauma* **15**: 837-849

Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O (1994) Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* **369**: 289-294

Revel JP, Karnovsky MJ (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* **33**: C7-C12

Robertson JD (1963) The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in mauthner cell synapses in goldfish brains. *J Cell Biol* **19**: 201-221

Ruta V, Chen J, MacKinnon R (2005) Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel. *Cell* **123**: 463-475

Salata JJ, Jurkiewicz NK, Wang J, Evans BE, Orme HT, Sanguinetti MC (1998) A novel benzodiazepine that activates cardiac slow delayed rectifier K⁺ currents. *Mol Pharmacol* **54**: 220-230

Sanchez-Chapula J (1988) Effects of bupivacaine on membrane currents of guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* **156**: 303-308

Schmidt D, Jiang QX, MacKinnon R (2006) Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* **444**: 775-779

Schmitz A, Sankaranarayanan A, Azam P, Schmidt-Lassen K, Homerick D, Hänsel W, Wulff H (2005) Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases. *Mol Pharmacol* **68**: 1254-1270

Schwid SR, Petrie MD, McDermott MP, Tierney DS, Mason DH, Goodman AD (1997) Quantitative assessment of sustained-release 4-aminopyridine for symptomatic treatment of multiple sclerosis. *Neurology* **48**: 817-821

Scott DB, Lee A, Fagan D, Bowler GM, Bloomfield P, Lundh R (1989) Acute toxicity of ropivacaine compared with that of bupivacaine. *Anesth Analg* **69**: 563-569

Seeböhm G, Chen J, Strutz N, Culberson C, Lerche C, Sanguinetti MC (2003) Molecular determinants of KCNQ1 channel block by a benzodiazepine. *Mol Pharmacol* **64**: 70-77

Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**: 1159-67

Sewing S, Roeper J, Pongs O (1996) Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron* **16**: 455-463

Shimada T, Somlyo AP (1992) Modulation of voltage-dependent Ca channel current by arachidonic acid and other long-chain fatty acids in rabbit intestinal smooth muscle. *J Gen Physiol* **100**: 27-44

Smith-Maxwell CJ, Ledwell JL, Aldrich RW (1998) Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol* **111**: 421-439

Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB (1993) A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* **101**: 513-543

Snyders DJ, Yeola SW (1995) Determinants of antiarrhythmic drug action. Electrostatic and hydrophobic components of block of the human cardiac hKv1.5 channel. *Circ Res* **77**: 575-583

Soler-Llavina GJ, Chang TH, Swartz KJ (2006) Functional interactions at the interface between voltage-sensing and pore domains in the Shaker K(v) channel. *Neuron* **52**: 623-634

Stefani E, Bezanilla F (1998) Cut-open oocyte voltage-clamp technique. *Methods Enzymol* **293**: 300-318

Striessnig J, Grabner M, Mitterdorfer J, Hering S, Sinnegger MJ, Glossmann H (1998) Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **19**: 108-115

Strutz-Seeböhm N, Gutcher I, Decher N, Steinmeyer K, Lang F, Seeböhm G (2007) Comparison of potent Kv1.5 potassium channel inhibitors reveals the molecular basis for blocking kinetics and binding mode. *Cell Physiol Biochem* **20**: 791-800

Swartz KJ (2008) Sensing voltage across lipid membranes. *Nature* **456**: 891-897

Swartz KJ, MacKinnon R (1997a) Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron* **18**: 665-673

Swartz KJ, MacKinnon R (1997b) Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels. *Neuron* **18**: 675-682

Tombola F, Pathak MM, Gorostiza P, Isacoff EY (2007) The twisted ion-permeation pathway of a resting voltage-sensing domain. *Nature* **445**: 546-549

Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY (2005) How far will you go to sense voltage? *Neuron* **48**: 719-725

Tseng-Crank J, Yao JA, Berman MF, Tseng GN (1993) Functional role of the NH₂-terminal cytoplasmic domain of a mammalian A-type K channel. *J Gen Physiol* **102**: 1057-1083

Valenzuela C, Delpon E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ (1995) Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J* **69**: 418-427

Valiyaveetil FI, Zhou Y, MacKinnon R (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel. *Biochemistry* **41**: 10771-10777

Vennekamp J, Wulff H, Beeton C, Calabresi PA, Grissmer S, Hansel W, Chandy KG (2004) Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxypsoralens: a new class of immunomodulators. *Mol Pharmacol* **65**: 1364-1374

Wang Z, Fermini B, Nattel S (1993) Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* **73**: 1061-1076

Wei A, Covarrubias M, Butler A, Baker K, Pak M, Salkoff L (1990) K⁺ current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science* **248**: 599-603

Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy KG (2003) The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest* **111**: 1703-1713

Xiao Y, Li X (1999) Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation. *Brain Res* **846**: 112-121

Xiao YF, Kang JX, Morgan JP, Leaf A (1995) Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11000-11004

Xu XP, Erichsen D, Börjesson SI, Dahlin M, Amark P, Elinder F (2008) Polyunsaturated fatty acids and cerebrospinal fluid from children on the ketogenic diet open a voltage-gated K channel: a putative mechanism of antiseizure action. *Epilepsy Res* **80**: 57-66

Yarov-Yarovoy V, Baker D, Catterall WA (2006) Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7292-7297

Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R (1991) Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* **251**: 939-942

Yellen G, Sodickson D, Chen TY, Jurman ME (1994) An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys J* **66**: 1068-1075

Yool AJ, Schwarz TL (1991) Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* **349**: 700-704

Yu W, Xu J, Li M (1996) NAB domain is essential for the subunit assembly of both alpha-alpha and alpha-beta complexes of shaker-like potassium channels. *Neuron* **16**: 441-453

Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW (1990) Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* **250**: 568-571

Zhou J, Augelli-Szafran CE, Bradley JA, Chen X, Koci BJ, Volberg WA, Sun Z, Cordes JS (2005) Novel potent human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel enhancers and their in vitro antiarrhythmic activity. *Mol Pharmacol* **68**: 876-884

Zimin PI, Garic B, Bodendiek SB, Mahieux C, Wulff H, Zhorov BS (2010) Potassium channel block by a tripartite complex of two cationophilic ligands and a potassium ion. *Mol Pharmacol* **78**: 588-599

6 Anhänge

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Aa	Arachidonsäure (englisch: <u>a</u> rachidonic <u>a</u> cid)
Abb.	Abbildung
ACh	<u>A</u> cetyl <u>ch</u> olin
cDNA	Englisch: „ <u>c</u> omplementary <u>DNA</u> “
cRNA	Englisch: „ <u>c</u> omplementary <u>RNA</u> “
DHP	<u>D</u> i <u>h</u> ydro <u>py</u> ridin
DMSO	<u>D</u> i <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> id
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: „ <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid“)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendinitrilotetra <u>a</u> cet <u>a</u> t
ERG	Englisch: „ <u>e</u> ther-a-go-go <u>r</u> elated <u>g</u> ene“
GYG-Sequenz	Glyzin-Tyrosin-Glyzin-Sequenz
HCN-Kanal	Englisch: „ <u>h</u> yperpolarisation-activated <u>c</u> yclic <u>n</u> ucleotide-gated channel“
HEPES	4-(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)- <u>p</u> iperazin-1- <u>e</u> thansulfonsäure
Kv-Kanal	<u>H</u> umaner spannungsgesteuerter (englisch: „ <u>v</u> oltage gated“) Kalium-Kanal
HUFA	hochgradig ungesättigten Fettsäure (englisch: <u>h</u> ighly <u>u</u> nsaturated <u>f</u> atty <u>a</u> cid)
ILT-Mutante	Dreifache Mutante des <i>Shaker</i> -Ionenkanals: V369 <u>I</u> , I372 <u>L</u> und S376 <u>I</u>
KcsA	Kalium-Kanal aus <i>Streptomyces lividans</i>
Kv-Kanal	Spannungsgesteuerter Kalium-Kanal
K ₂ P-Kanäle	Zwei-Porendomänen Kalium-Kanäle (englisch: two- pore domain potassium channel)
Kv2.1 ST	Kv2.1 <u>S</u> eiten <u>t</u> asche
Kv2.1 ST+ZK	Kv2.1 <u>S</u> eiten <u>t</u> asche und <u>z</u> entrale <u>K</u> avität
LB(A)-Medium/-Platten	<u>L</u> ysogeny <u>B</u> roth-Medium/-Platten (<u>A</u> mpicillin)
LQT-Syndrom	Englisch: „ <u>L</u> ong <u>Q</u> T-syndrome“

MDs	molekulardynamische Simulationen (englisch: <u>M</u> olecular <u>d</u> ynamics <u>s</u> imulation)
min	Minuten
mRNA	Englisch: „ <u>m</u> essenger RNA“
n	Anzahl der Experimente (englisch: number of experiments)
Na _v 1.2-Kanal	spannungsgesteuerter (englisch: <u>v</u> oltage gated) <u>N</u> atriumkanal 1.2
NavAb-Kanal	spannungsgesteuerter (englisch: <u>v</u> oltage gated) <u>N</u> atrium-Ionenkanal aus <u>A</u> rcobacter <u>b</u> utzi
ne	<u>n</u> icht funktionell <u>e</u> xprimierend
NTP	<u>N</u> ukleotid- <u>T</u> riphosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: „ <u>p</u> olymerase- <u>c</u> hain- <u>r</u> eaction“)
PD	Porenbildende Segmente (englisch: <u>p</u> ore forming <u>d</u> omains)
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Psora-4	5-(4-phenylbutoxy)psoralen
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäure (englisch: <u>P</u> oly <u>u</u> nsaturated <u>f</u> atty <u>a</u> cid)
PVP-Sequenz	<u>P</u> rolin- <u>V</u> alin- <u>P</u> rolin-Sequenz
rKv1.2	Kv1.2 der Ratte (<u>r</u> attus norvegicus)
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: „ <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid“)
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: „ <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute“)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (englisch: „ <u>S</u> tandard error of the <u>m</u> ean“)
S1-S6 Segmente	Transmembranhelices
TAE-Puffer	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA Puffer
TEA	<u>T</u> etra <u>e</u> thyl <u>a</u> mmonium
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (englisch: „ <u>t</u> wo- <u>e</u> lectrode- <u>v</u> oltage- <u>c</u> lamp“)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

UV	<u>U</u> ltrav <u>i</u> olett
VSD	spannungswahnehmende Segmente (englisch: <u>v</u> oltage <u>s</u> ensing <u>d</u> omains)
WT	Wildtyp

Im Abbildungsverzeichnis nicht aufgelistet sind Abkürzungen der deutschen Sprache nach dem Duden, die Formelzeichen des internationalen Einheitensystems (Le Système international d'unités, SI) und davon abgeleitete Einheiten, sowie Abkürzungen für chemische Elemente. Diese wurden nach dem Periodensystem der Elemente (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) aufgeführt.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.3-1: Die Struktur einer Kv α -Untereinheit der Kv-Kanäle	7
Abb. 1.2.1-1: Die Kristallstruktur der rKv1.2-Ionenkanals	8
Abb. 1.2.2-1: Die Struktur der zentralen Ionenkanalpore.....	9
Abb. 1.2.2-2: Der Selektivitätsfilter der Kv-Kanäle.....	10
Abb. 1.2.3-1: Die Anordnung der spannungswahnehmenden Segmente im Ionenkanal.....	10
Abb. 1.2.3-2: Modelle der S4-Bewegung.....	12
Abb. 1.2.3-3: Kopplung des S4-S5-Linkers an die porenbildenden Segmente des Kv1.2-Ionenkanals	12
Abb. 1.2.5-1: Die ILT-Mutation im <i>Shaker</i> -Ionenkanal.....	15
Abb. 1.2.5-2: Position der ILT- und „internal cluster“-Aminosäuren im Kv1.5-Ionenkanal	16
Abb. 1.2.6-1: Laterale Fenster bilden eine Verbindung zwischen Membran und der zentralen Pore	17
Abb. 1.3.1-1: Interaktion des Kv1.5-Ionenkanals mit S0100176 oder AVE0118	18
Abb. 1.3.4-1: Der Effekt von Psora-4 auf die Kv1.3-abhängigen T _{EM} -Zellen	23
Abb. 1.3.5-1: Die Interaktion eines spannungsgesteuerten Kalium-Kanals mit unterschiedlich geladenen Lipiden	25
Abb. 2.2.7-1: Die TEVC-Spannungsprotokolle	39
Abb. 3.1.1-1: Die Inhibition des Kv1.5-Ionenkanals durch Bupivacain	41
Abb. 3.1.2-1: Effekt von Kv β 1.3 auf die Stereoselektivität der Inhibition durch Bupivacain	42
Abb. 3.2.1-1: Konservierung der zentralen Pore der Kv-Kanäle	44
Abb. 3.2.1-2: Die Konzentrations-Wirkungskurve von Psora-4.....	45
Abb. 3.2.1-3 Die „first-pulse“-Experimente	46
Abb. 3.2.2-1: Alanin-Scan des S6-Segments mit 500 nM Psora-4	47
Abb. 3.2.2-2: Veränderung des IC ₅₀ -Werts für Ionenkanalmutanten des S6-Segments.....	48
Abb. 3.2.2-3: Position der im Alanin-Scan identifizierten Aminosäurereste	49
Abb. 3.2.3-1: Alanin-Scan des S5-Segments mit 500 nM Psora-4	50
Abb. 3.2.4-1: Alanin-Scan des S4-Segments und des S4-S5-Linkers mit 500 nM Psora-4	52
Abb. 3.2.5-1: Kontrollexperiment: Alanin-Scan mit Bupivacain.....	53
Abb. 3.2.5-2: Kontrollexperiment: Keine Korrelation zwischen der Inhibition und der Inaktivierung der Ionenkanalmutanten.....	54

Abb. 3.2.5-3:	Kontrollexperiment: Die $V_{1/2}$ -Werte der Ionenkanalmutanten des S4-Segments und des S4-S5-Linkers	55
Abb. 3.2.6-1:	Docking von Psora-4 in ein Modell des Kv1.5-Ionenkanals.....	56
Abb. 3.2.7-1:	Ergebnis der MDss mit Psora-4 im Kv1.5-Ionenkanal.....	58
Abb. 3.2.7-2:	Übersicht über die Interaktionen von Psora-4 mit der zentralen Pore des Kv1.5-Ionenkanals.....	59
Abb. 3.2.7-3:	Übersicht über die Interaktionen von Psora-4 mit den hydrophoben Seitentaschen	60
Abb. 3.2.8-1:	Konservierung der Psora-4-Bindungsstelle im Kv1.5- und Kv2.1-Ionenkanal.....	61
Abb. 3.2.8-2:	Das Einbringen von Kv1.5-ähnlichen Seitentaschen ermöglicht eine Inhibition durch Psora-4.....	62
Abb. 3.2.8-3:	Ko-Expressionen von Kv1.5-WT- und mutierten Ionenkanälen	63
Abb. 3.2.8-4:	Auswirkung einer Mutation in einer der Bindungsstellen auf die Konzentrations-Wirkungskurve.....	64
Abb. 3.2.9-1:	Ergebnis der 50 ns MDss: Psora-4 lagert sich in der Membran an.....	65
Abb. 3.2.9-2:	Laterale Fenster fungieren als „Durchgang“ zwischen der zentralen Kavität und den hydrophoben Seitentaschen	66
Abb. 3.2.10-1:	Psora-4 erreicht die Porenschleife des Ionenkanals	67
Abb. 3.2.10-2:	Die Interaktion von Psora-4 mit der Porenhelix	68
Abb. 3.2.10-3:	Kontrollexperimente zum Alanin-Scan der Porenschleife.....	68
Abb. 3.2.10-4:	Die Interaktion von Psora-4 mit A503.....	69
Abb. 3.2.11-1:	Psora-4 beeinflusst die QV-Beziehung nicht.....	71
Abb. 3.2.11-2:	Psora-4 beeinflusst die GV-Beziehung nicht.....	72
Abb. 3.2.11-3:	Die Inhibition durch Psora-4 ist nicht spannungsabhängig	73
Abb. 3.2.12-1:	Der Psora-4-Inhibitionsmechanismus: Charakterisierung des Psora-4-Blocks	74
Abb. 3.2.12-2:	Der Psora-4-Inhibitionsmechanismus: Zeitverlauf und Reversibilität des Psora-4-Blocks	75
Abb. 3.2.12-3:	Der Psora-4-Inhibitionsmechanismus: Bildung eines stabilen Komplexes aus Ionenkanal und Psora-4	76
Abb. 3.3.1-1:	RNA-Editierung in der zentralen Pore verhindert die Blockade des Kv1.1-Ionenkanals durch AA	78
Abb. 3.3.1-2:	Konkurrenz von AA und TEA um die Bindungsstelle der zentralen Pore	79
Abb. 3.3.2-1:	Docking von Anandamid in ein Kv1.5-Homologiemodell	80
Abb. 3.4.1-1:	Umfang des Alanin-Scans im Kv1.5-Ionenkanal	81

Abb. 3.4.1-2: Analyse des Alanin-Scans	82
Abb. 3.4.2-1: Analyse des 1. Parameters: Inhibition durch 20 μ M Aa	83
Abb. 3.4.2-2: Repräsentative Beispiele der Inhibition durch 20 μ M Aa	84
Abb. 3.4.3-1: Analyse des 2. Parameters: Veränderung des Peakstroms durch Applikation von 20 μ M Aa.....	86
Abb. 3.4.3-2: Die Veränderung des Peakstroms aufgetragen gegen die $V_{1/2}$ -Werte der Ionenkanalmutanten.....	87
Abb. 3.4.3-3: Repräsentative Beispielmessungen von Ionenkanalmutanten mit verändertem Aa-Effekt auf den Peakstrom.....	88
Abb. 3.4.4-1: Analyse des 3. Parameters: Aa-induzierte Inaktivierung	89
Abb. 3.4.4-2: Keine Korrelation der Aa-induzierten Inaktivierung mit den $V_{1/2}$ -Werten der Ionenkanalmutanten.....	90
Abb. 3.4.4-3: Beispiele von TEVC-Messungen von Ionenkanalmutanten mit veränderter Aa-induzierter Inaktivierung.....	90
Abb. 3.4.5-1: Übersicht der signifikant veränderten Aa-Effekte auf Ionenkanalmutanten der zentralen Kavität	92
Abb. 3.4.5-2: Übersicht der signifikant veränderten Aa-Effekte auf Ionenkanalmutanten der extrazellulären Bereiche.....	93
Abb. 3.4.5-3: Übersicht der signifikant veränderten Aa-Effekte auf Ionenkanalmutanten der hydrophoben Seitentaschen.....	94
Abb. 3.4.5-4: Übersicht der signifikant veränderten Aa-Effekte auf Ionenkanalmutanten des S4-Segments und des S3-S4-Linkers	95
Abb. 3.4.5-5: Position der Aminosäuren, deren Mutation zu einer Veränderung des Aa-Effekts auf den Peakstrom führte.....	96
Abb. 3.4.5-6: Übersicht über weitere Ergebnisse und Gruppen von Ionenkanalmutanten mit signifikanten Änderungen mehrerer Parameter	97
Abb. 3.4.6-1: Zusammenhang des $V_{1/2}$ -Werts der Ionenkanalmutanten und der Verschiebung des $V_{1/2}$ -Werts durch Applikation von 20 μ M Aa.....	98
Abb. 4.2.4-1: Lipide in der Kristallstruktur des rKv1.2-Ionenkanals.....	105
Abb. 4.3.1-1: Die Interaktion von PAP-1 mit dem Kv1.3-Ionenkanal.....	107
Abb. 4.3.2-1: Modell der Dihydropyridin-Bindungsstelle	109

6.3 Eigene Publikationen

Die in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse sind Bestandteil der folgenden Publikationen:

Arias C, Guizy M, David M, **Marzian S**, Gonzalez T, Decher N, Valenzuela C (2007) Kvbeta1.3 reduces the degree of stereoselective bupivacaine block of Kv1.5 channels. *Anesthesiology* 107: 641-651

Decher N, Streit AK, Rapedius M, Netter MF, **Marzian S**, Ehling P, Schlichthorl G, Craan T, Renigunta V, Kohler A, Dodel RC, Navarro-Polanco RA, Preisig-Muller R, Klebe G, Budde T, Baukrowitz T, Daut J (2010) RNA editing modulates the binding of drugs and highly unsaturated fatty acids to the open pore of Kv potassium channels. *EMBO J* 29: 2101-2113

Marzian S, Stansfeld PJ, Rapedius M, Rinné S, Nematian-Ardestani E, Abbruzzese JL, Steinmeyer K, Sansom MS, Sanguinetti MC, Baukrowitz T, Decher N (2013) Side pockets provide the basis for a new mechanism of Kv channel-specific inhibition. *Nat Chem Biol* 9: 507-513

Marzian S. (2009) Diplomarbeit: Systematische Analyse der Bupivacain-Bindungsstelle im Kv1.5-Ionenkanal.

Marzian S, Stansfeld PJ, Abbruzzese J, Sansom MS, Sanguinetti MC, Decher N (2012) A Novel Binding site and Blocking Mechanism Determines the Molecular Basis for Ion Channel Drug Specificity. 91st annual meeting der Deutschen Physiologischen Gesellschaft

Weitere eigene Publikation:

Wemhöner K, Silbernagel N, **Marzian S**, Netter MF, Rinné S, Stansfeld PJ, Decher N (2012) A leucine zipper motif essential for gating of hyperpolarization-activated channels. *J Biol Chem* 287: 40150-40160

6.4 Liste der akademischen Lehrer

Philipps-Universität Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Aumüller, Bastians, Bauer, Becker, Boekhoff, Brehm, Bröring, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Del Rey, Dietrich, Eckhardt, Eilers, Elsässer, Feuser, Garn, Garten, Glorius, Grzeschik, Hasilik, Hassel, Homberg, Huber, Jacob, Jungclas, Kaufmann, Kira, Kirchner, Knöller, Koolmann, Krebber, Lang, Lill, Liss, Löffler, Löffler, Luers, Maisner, Mederos-y-Schnitzler, Moll, Müller, Müller-Brüsselbach, Nau, Oeffner, Oliver, Petz, Plant, Preisig-Müller, Röhm, Röper, Schäfer, Schulz, Schütz, Schwarz, Seitz, Suske, Voigt, Vollmer, Weihe, Weiser, Westermann, Yu

Universidad Complutense de Madrid:

Valenzuela

6.5 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Niels Decher für das Bereitstellen der interessanten Themen und die intensive Betreuung. Ihm möchte ich dafür danken, dass er mich für die Wissenschaft begeistert und stets gefördert hat.

Ein großer Dank gilt der Studienstiftung des deutschen Volkes für die Förderung meiner Promotion.

Außerdem gilt mein Dank unseren Kollaborationspartnern, den Gruppen von Prof. Dr. Sansom in Oxford und von Prof. Dr. Klebe in Marburg für das Erstellen von Dockings und molekulardynamische Simulationen, von Prof. Dr. Baukrowitz in Kiel für die Durchführung der „inside-out macropatch“-Experimente und von Prof. Dr. Sanguinetti in Salt Lake City für das Messen der gating currents.

Ich bedanke mich auch bei allen meinen Kollegen am Institut für Physiologie und Pathophysiologie in Marburg für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dr. Anne-Kathrin Streit danke ich für alle hilfreichen Diskussionen und Ratschläge und Dr. Michael Netter für die Hilfe bei EDV-Problemen. Mein Dank gilt außerdem Oxana Nowak, Vanessa Huhn, Kirsten Ramlow und Brigitte Burk für die technische Unterstützung und den Mitarbeitern der Werkstatt für die Hilfe bei den Problemen im Laboralltag. Ein Dank für die vielseitige Unterstützung geht außerdem an Dr. Konstantin Wemhöner, Dr. Maren Limberg und Dr. Magdalena Walecki. Ein großer Dank gilt den aktuellen und ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Decher für das produktive Miteinander und den vielen Spaß rund um die Arbeit.

Für das „Korrekturlesen“ dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Dr. Anne-Kathrin Streit, Christian Haas und Barbara Marzian.

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Familie, besonders bei meinen Eltern Norbert und Barbara Marzian und meinem Mann Daniel Marzian, die durch ihre Unterstützung die Doktorarbeit erst möglich gemacht haben.